

## 平成20年度各分野における学会賞(学術賞)等の受賞者

雑誌名	東北医学雑誌
巻	121
号	1
ページ	56-118
発行年	2009-06
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/51434">http://hdl.handle.net/10097/51434</a>

—— 第 73 回循環器学会 Young Investigator's Award ——

## 心血管疾患の病態メカニズムにおいて、骨髄由来前駆細胞は 異なった役割を果たす

—— マウス低酸素性肺高血圧モデル、下肢虚血モデルにおける  
骨髄由来前駆細胞の役割の検討 ——

中野 誠, 福本 義弘, 佐藤 公雄, 伊藤 愛剛  
加賀谷 豊, 下川 宏明

東北大学大学院医学系研究科 循環器病態学分野



**Abstract :** *Background :* Accumulated evidence suggests that endothelial progenitor cells (EPCs) contribute to angiogenesis in patients with ischemic cardiovascular diseases. In contrast, recent reports showed the existence of BM-derived progenitor cells that differentiate into  $\alpha$ -

smooth muscle actin (SMA)<sup>+</sup> cells, which may participate in the progression of atherosclerosis and lung fibrosis. However, it is controversial whether those BM-derived progenitor cells are beneficial or harmful. *Aim :* In this study, we addressed individual roles of smooth muscle progenitor cells (SMPCs) and EPCs, in terms of statin treatment and modulation erythropoietin (Epo)/Epo receptor (EpoR) system. *Methods and Results :* Pravastatin ameliorated hypoxia-induced PAH associated with a decrease in the number of circulating VEGF-2<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup> progenitors, which are considered as SMPCs, through suppression of SDF-1/CXCR4 pathways. Mice lacking EpoR in non-erythrocyte lineage (EpoR<sup>-/-</sup>-rescued mice) demonstrated accelerated pulmonary vascular remodeling in hypoxia-induced PAH. Also, EpoR<sup>-/-</sup>-rescued mice had impaired angiogenesis in hindlimb ischemia associated with an impaired EPC mobilization. *Conclusions :* These results indicate that progenitor cells play differential roles in the pathogenesis of

cardiovascular diseases. Although the promotion of BM-derived progenitor cells could be a new therapeutic strategy for the treatment of cardiovascular diseases, we should consider the types and characteristics of BM-derived progenitor cells.

**Key words :** progenitor cells, cytokine, angiogenesis, hypertension, pulmonary, peripheral vascular disease

### 目 的

我が国では、重症の虚血性心血管疾患が増加しており、経皮的血管形成術や外科手術の適応外となった場合、その予後は極めて不良である。近年の研究により、骨髄由来血管内皮前駆細胞による血管新生が有用な治療法として注目を浴びている。その一方、骨髄由来前駆細胞が動脈硬化や肺線維症を促進するという報告も存在し、これらの細胞集団の詳細な検討はまだなされていない。本研究では、骨髄由来前駆細胞の各病態における役割を、スタチン、エリスロポエチンのような薬剤、液性因子との関連という観点から検討した。

### 方法・結果

＜プロトコール1＞ 野生型マウスを無作為にプラバスタチン投与群 (2 mg/kg/day), vehicle 投与群に割りつけ、5 週間慢性低酸素 (酸素 10%) に暴露した。対照群の野生型マウスは大気環境下で飼育した。低酸素により、マウス末梢血中の CXCR4<sup>+</sup>/VEGFR2<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup> 陽性細胞の動員ならびに血清中の SDF-1 は対照

群に比して有意に増加したが、これらはプラバスタチン投与により、有意に減少した (Figure 1A, 1B, 1C). プラバスタチン投与により、右室収縮期圧ならびに右室/左室重量比も有意に改善した (Figure 1D, 1E).

<プロトコール 2> 野生型マウス (WT), ならびに血球系細胞以外の EpoR を選択的に欠損させたマウス (EpoR<sup>-/-</sup>-rescued) を 5 週間慢性低酸素 (酸素 10%) に暴露した. 対照群の WT, EpoR<sup>-/-</sup>-rescued は大気環境下で飼育した. 低酸素暴露により, WT, EpoR<sup>-/-</sup>-rescued とともに, 大気飼育群に比し, 右室収縮期圧, 右室/左室重量比の上昇を呈したが, EpoR<sup>-/-</sup>-rescued では WT に比し, その上昇が有意に増加していた (Figure 2A, 2B). 低酸素暴露により, 末梢血中の EPC は大気飼育群に比し, WT, EpoR<sup>-/-</sup>-rescued とともに増加したが, WT に比し, EpoR<sup>-/-</sup>-rescued ではその増加が有意に損なわれていた (Figure 2C).

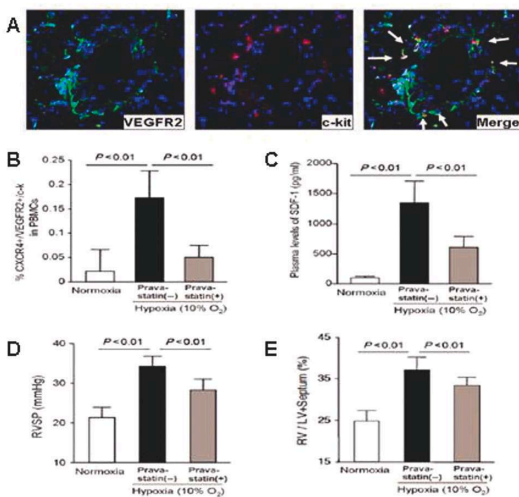


Figure 1.

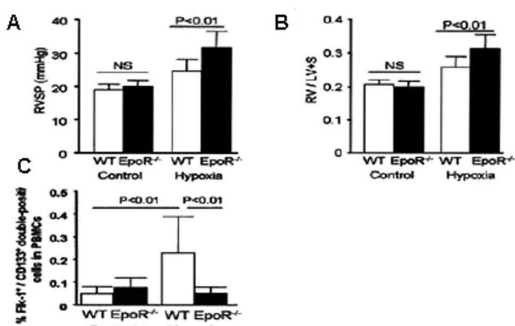


Figure 2.

<プロトコール 3> 野生型マウス (WT) および EpoR<sup>-/-</sup>-rescued に下肢結紮虚血を作成し, 虚血後の血管新生を検討した. WT に比し EpoR<sup>-/-</sup>-rescued では, 結紮 2 週後の患肢/健肢のドップラー血流比は有意に低下し (Figure 3A), 末梢血中の EPC 数も有意に減少していた (Figure 3B). 骨髄由来細胞の動員に与するサイトカインとして血管内皮増殖因子 (VEGF) が知られているため, 虚血組織における VEGF の発現を調べると, EpoR<sup>-/-</sup>-rescued の虚血下肢では VEGF の発現も有意に低下しており (Figure 3C, 3D), EpoR<sup>-/-</sup>-rescued では血管新生に重要な役割を果たす骨髄由来細胞の遊走および成長因子の発現が抑制されていることが明らかとなった. 次いで EPC を含む骨髄由来細胞における EpoR, ならびに虚血組織の EpoR の役割を分離して検討する目的で WT および EpoR<sup>-/-</sup>-rescued を WT もしくは EpoR<sup>-/-</sup>-rescued の骨髄 (BM) で置換 (4 群作成: WT-WT BM, WT-EpoR<sup>-/-</sup> BM, EpoR<sup>-/-</sup>-WT BM, EpoR<sup>-/-</sup>-EpoR<sup>-/-</sup> BM) すると, EpoR<sup>-/-</sup>-WT BM では EpoR<sup>-/-</sup>-EpoR<sup>-/-</sup> BM に比しドップラー血流比が有意に改善

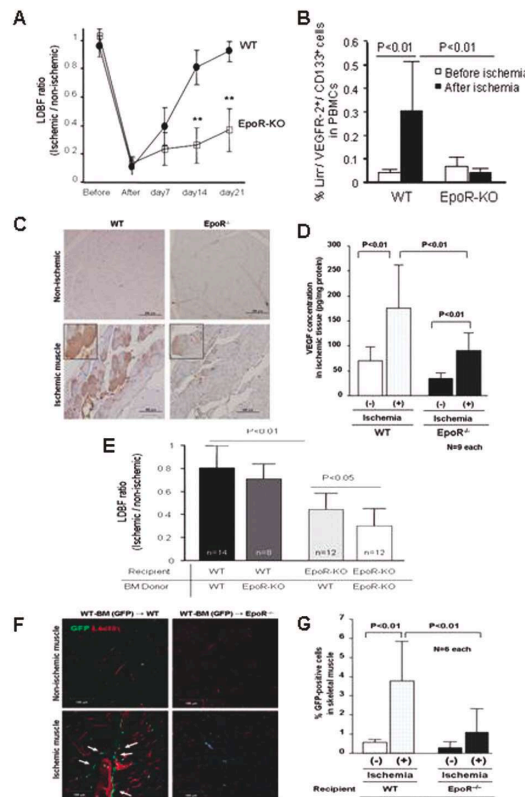


Figure 3.

したが、WT-WT BM のドップラー血流比の半分までの改善に留まった (Figure 3E)。虚血組織への骨髄由来細胞の遊走を検討するため、WT, EpoR<sup>-/-</sup>-rescued の骨髄を GFP 陽性マウスの骨髄で置換すると、WT に比し EpoR<sup>-/-</sup>-rescued の虚血下肢では、骨髄由来細胞の遊走が抑制されていた (Figure 3F, 3G)。

## 結 論

本研究の結果から、骨髄由来前駆細胞は各病態にお

いて異なった役割を呈することが示された。つまり、血管内皮前駆細胞は低酸素性肺高血圧モデルにおいて、血管リモデリングから肺血管床を保護する役割を、また、虚血組織において血管新生を促す役割を果たすが、その一方、平滑筋前駆細胞は低酸素性肺高血圧モデルにおいて、肺血管リモデリングを促進する役割を有する。骨髄由来前駆細胞は心血管疾患における新たな治療オプションであるが、我々はそれらの細胞集団の種類、特性を熟知した上で治療戦略を立てるべきであると考えられる。

—— 第 15 回分子消化器病研究会「浜名湖シンポジウム」特別賞 ——

## クローン病感受性遺伝子 TNFSF15 遺伝子多型における機能解析

角田 洋一, 木内 喜孝, 植木 紳夫, 遠藤 克哉

根来 健一, 高橋 成一, 下瀬川 徹

東北大学大学院医学系研究科 消化器病態学分野



## 背景

クローン病 (Crohn's disease: CD) は, その発症に遺伝因子と環境因子の双方が関わる多因子疾患である。近年のゲノム医学の進歩はめざましく, 2001 年 CD の最初の感受性遺伝子 CARD15 の同定をはじめとして, その後さまざまな人種

での感受性遺伝子の同定がすすんでいる。日本人 CD では, 2005 年に遺伝子ベースで設定された約 8 万 SNP をマーカーとした大規模な相関解析により, 9 番染色体長腕に存在する TNFSF15 遺伝子が感受性遺伝子候補であると報告され, 我々の replication study でもその強い相関が確認された<sup>1,2)</sup>。TNFSF15 はデスドメインをもつ DR3 (death receptor 3) のリガンドで, T 細胞からの INF $\gamma$  産生を誘導する強力な T 細胞刺激物質として働き, 主に樹状細胞やマクロファージ, T 細胞に発現し, 小腸粘膜にホーミングする CD4+, CCR9+ の T 細胞が刺激を受けやすいこと, CD 患者の腸管病変部の粘膜固有層に TNFSF15 の発現が著明に増加していることなどから, CD の腸管病変局所での反応に重要な役割を果たすサイトカインと考えられている<sup>3)</sup>。TNFSF15 遺伝子周辺には複数の SNP が存在するものの互いに強い連鎖不平衡にあり, 日本人ではそれらの SNP が構成するハプロタイプは CD リスク, ノンリスクアリの大きく 2 つのアリルが全体の 80% 以上を占める。そのため, 構成するどの SNP が CD の発症に真に関連しているかは推測が難しい。相関を示す SNP はエクソン領域には一つだけで, その一つはアミノ酸置換をもたらさない (synonymous SNP) ことや, 前述のように CD 患者での発現が亢進していることなどからいずれかの SNP が TNFSF15 遺伝子の発現に影響を与える regulatory SNP である可能性がある。多因子疾患で感受性を示す SNP には regulatory SNP と考えられるものが多いものの, そ

の感受性を示すメカニズムは不明のままである。その理由の一つは regulatory SNP を解析していくストラテジーに起因する。そしてその結果, よく解析に用いられる *in vitro* の単純な系での解析結果と, 実際 *in vivo* で起こっている現象との不一致がしばしば経験される<sup>4)</sup>。そこで我々は, まず *in vivo* に近い状態における regulatory SNP の mRNA 量への影響と, その影響が確認される細胞種を確認し, その情報を元に *in vitro* の解析を行う必要があると考えた。

## 目的

TNFSF15 の発現と遺伝子多型と発現量の変化について, その多型の機能的な解析を *in vivo* に近い状態で検討し, その結果を反映する *vitro* での系を作成し, 遺伝子多型が発現制御に影響を与えるメカニズムを解明する。

## 方法

ボランティア (リスクアリルと非リスクアリルをヘテロに保有するヒト) 13 人より末梢血単核球 (PBMC) を採取し, LPS で刺激したもの, PHA で刺激したものをを用いて, TNFSF15 のアリルによる発現量の違い (allelic imbalance) を確認した。Allelic imbalance はリスクアリル, 非リスクアリルの各アリル由来 mRNA にある +603A/G をマーカーとし, その多型の量の比を SNaPshot で測定し, 各アリルの転写活性の違いを推測することで確認した (図 1)。また, これにより恒常的にアリルによる発現に imbalance を示す細胞種を特定した。特定された細胞種について, 転写活性に変化を与える SNP の特定のため 5' 領域に存在する 2 つの SNP の組み合わせでプラスミドを作成し Promoter assay を, また両 SNP について特定のアリルに転写因子が結合するかどうか, どの細胞種に存在する転写因子なのかの特定のため EMSA を行った。

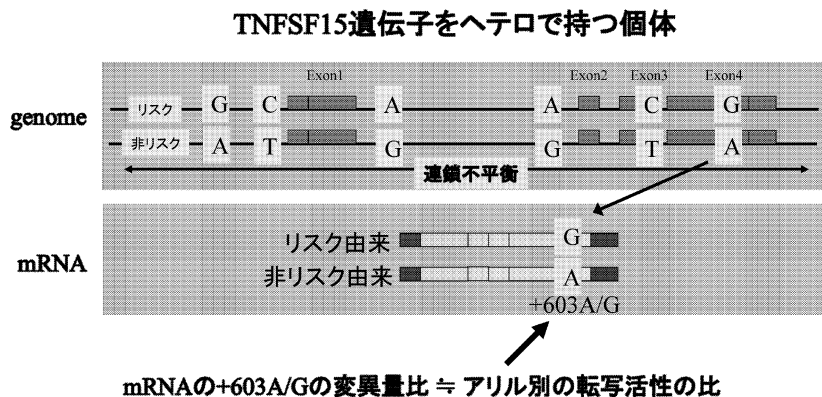


図 1. Allele specific transcripts の定量

### 全体量に占めるCDリスクアリルの割合

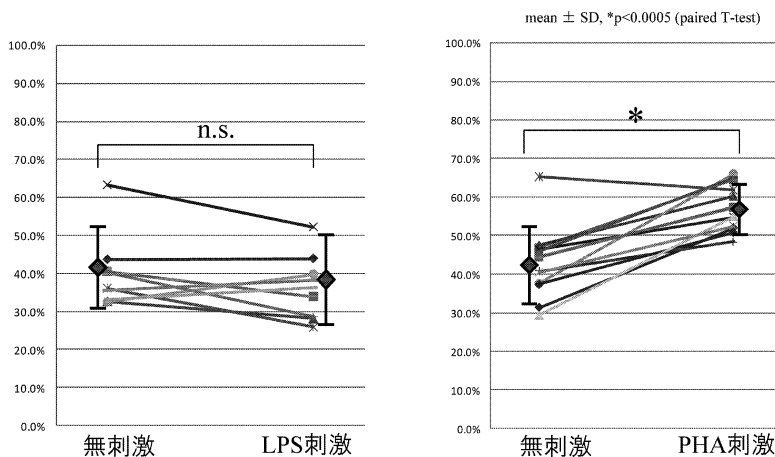


図 2. PBMC 刺激時のアリル比の変化

## 結 果

PBMC は PHA, LPS 刺激下いずれでも TNFSF15-mRNA の発現が有意に増加していた。SNaPshot によるアリル比の測定の結果、PHA 刺激時では CD リスクアリル由来の mRNA が非リスクアリル由来に比べてより発現量が増加しており、すくなくとも T リンパ球では allelic imbalance が存在することがわかった (図 2)。これをもとに、T リンパ球での allelic imbalance のメカニズムを解明するため、T リンパ球系の培養細胞として Jurkat を用いて *vitro* での検討を加えた。

Jurkat を用いた Promoter assay では、刺激時において -360C/T で転写活性に差を認め、-360C (CD リスクアリル) で有意に高かった。また EMSA では

-360T アリル特異的な shift band を認めた。

## 考 察

今回の検討の結果、TNFSF15 遺伝子の CD リスクアリルで、T リンパ球特異的に転写活性が亢進していることが *vivo* に近い状態と *vitro* での両方で確認され、*vitro* での検討でその変化をもたらす多型が 5' 領域にある -360C/T であることが予測された。また EMSA の結果から -360T アリルに特異的な転写因子の結合が確認されたことから、CD 非リスクアリルに何らかの抑制的な転写因子あるいはその複合体などの結合が考えられる。つまり、-360C アリルにはこの抑制因子が結合しないために発現が相対的に亢進し、実際の CD 患者での発現量の増加の一因となっている可

能性がある。これらのことは、TNFSF15 遺伝子多型がクローン病の感受性に影響を与えている要因の一部を示していると考えられる。今後は、-360T に結合する転写因子の同定など多型と発現量変化のより詳細なメカニズム解明をする必要がある。

## 文 献

- 1) Yamazaki, K., McGovern, D., Ragoussis, J., et al. (2005) Single nucleotide polymorphisms in TNFSF15 confer susceptibility to Crohn's disease. *Hum. Mol. Genet.*, **14**, 3499-3506.
- 2) Kakuta, Y., Kinouchi, Y., Negoro, K., et al. (2006) Association study of TNFSF15 polymorphisms in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *Gut*, **55**, 1527-1528.
- 3) Bamias, G., Martin, C., 3rd, Marini, M., et al. (2003) Expression, localization, and functional activity of TL1A, a novel Th1-polarizing cytokine in inflammatory bowel disease. *J. Immunol.*, **171**, 4868-4874.
- 4) Cirulli, E.T. and Goldstein, D.B. (2007) *In vitro* assays fail to predict in vivo effects of regulatory polymorphisms. *Hum. Mol. Genet.*, **16**, 1931-1939.

—— 平成 20 年度日本眼科学会学術奨励賞 ——

## 網膜興奮毒性における白血球眼内遊走を介した間接的網膜神経細胞死とスタチンによる神経保護作用

中 澤 徹

東北大学大学院医学系研究科 神経・感覚器病態学講座眼科・視覚科学分野



### 緒 言

失明に繋がる多くの眼疾患において、網膜神経細胞死は視力低下の直接的な原因として重要である。そのため、その疾患における基本病態を把握し神経細胞死に繋がる根本治療開発が望まれている。しかし、現実的には病態の根本的病態把握は現状

では難しく、病態の中での障害因子を同定し、対症療法として網膜神経細胞をその障害から一次的に保護する治療（神経保護治療）を行うことが治療開発の第一歩として重要である。我々は臨床データからの完全な病態解明は困難であることから、動物の病態モデルを作成し、その機序解明から臨床にフィードバックする方法を選択した。これまでの様々な基礎研究の成果から、網膜疾患の神経細胞死では、虚血、グルタミン酸障害、炎症、栄養因子の欠損、酸化ストレスなどが複雑に関与することが考えられている（図 1）。一つ一つの基本障害因子に拮抗する薬剤を組み合わせる使用する神経保護治療の開発は、多くの網膜疾患の治療に広く応用できる考え方である。

NMDA 受容体の過剰な反応により神経細胞死が起る神経興奮毒性は、アルツハイマー病など多くの神経変性疾患で重要と考えられている<sup>8)</sup>。中枢神経系の一つである網膜においても、網膜虚血は、臨床的に網膜疾患において、よく遭遇する予後不良な病態である。虚血が関与する疾患には、糖尿病網膜症<sup>1,4,6)</sup>や網膜血管閉塞症<sup>9)</sup>、網膜剝離<sup>2)</sup>があり（図 2）、その際眼内のグルタミン酸が増加していると言われている。網膜虚血でもグルタミン酸による興奮毒性により網膜神経細胞死が起こり、主に神経細胞に局在する N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) 型グルタミン酸受容体を介して起こると<sup>5)</sup>と考えられてきた。

本研究では、網膜虚血障害による網膜神経節細胞死

の機序を解明するために、動物の眼内に NMDA を投与することにより、網膜神経細胞死を引き起こすシンプルな実験系を用いて、その障害の機序を詳細に調べた。また早期の臨床応用を考えると、既に眼科以外の分野で臨床応用されている薬剤で、神経保護治療を有する薬剤の探索が効率的である。最近臨床で抗脂血症剤として使用されている、スタチンが神経興奮毒性に対し神経保護作用があることが証明された<sup>10)</sup>、しかしその機序解明は不十分であり、その神経保護作用の機序解明を行った。

### 方 法

#### 動物と手術

204 匹の 300-350 グラムの雄 SD ラットと 98 匹の 20-25 グラムの雄 C57BL/6 マウスを使用した。NMDA 障害は、ラット眼内に 10 mM の NMDA を 2  $\mu$ l、マウス眼内に 1, 10, 30, 100 mM の NMDA を 1  $\mu$ l マイクロインジェクションすることにより行った。ICAM-1 抗体による白血球接着阻害実験では、2 mg/kg の goat anti-mouse ICAM-1 抗体 (AF796; R & D system) を NMDA 障害の 5 分前に血中に投与した。スタチンには 0.1, 3 mg/kg の Pitavastatin (興和株式会社, 東京) を用い、連日経口投与した。

#### 網膜神経節細胞の逆行性染色

NMDA による網膜神経節細胞死を定量するために、NMDA 障害後 4 日目に視神経に直接蛍光色素である 1% フルオロゴールドを注入した。網膜伸展標本で生存網膜神経節細胞密度を計測した。

#### 白血球網膜血管接着の評価

血管内細胞と白血球に接着する特性のある FITC の結合した concanavalin A lectin (20  $\mu$ g/ml, Vector Laboratories) で網膜血管内に癒着する白血球数を測定した。



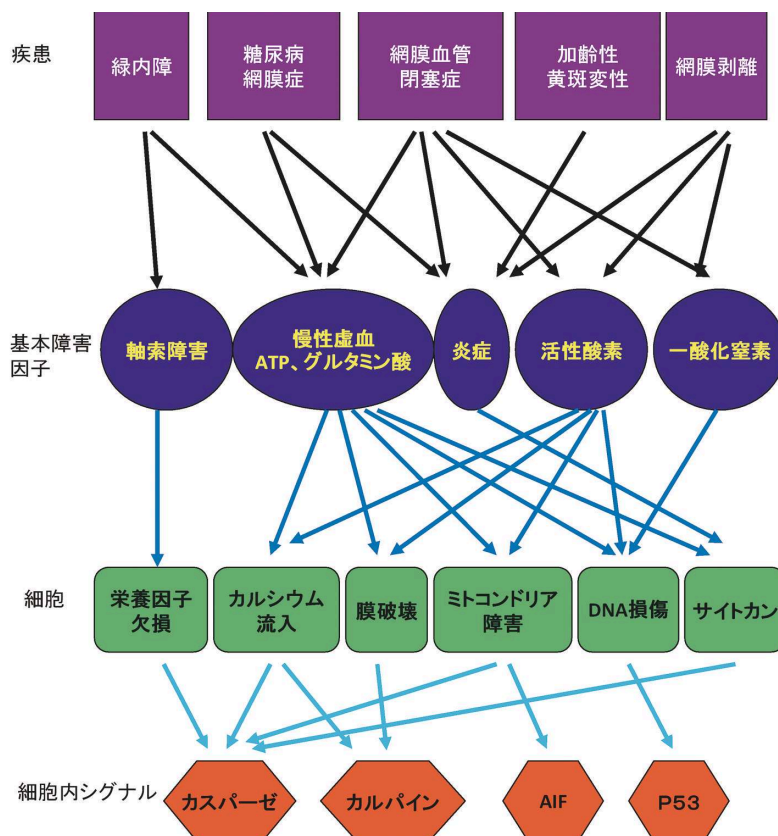


図1. 眼疾患の神経細胞死の原因

網膜疾患による神経細胞死の原因には、その基本障害因子として、軸索障害、慢性虚血、炎症、活性酸素、一酸化窒素などがあり、その障害により細胞では栄養因子欠損、カルシウムの細胞内流入、膜破壊、ミトコンドリア障害、DNA 損傷、サイトカイン暴露が起こる。その結果細胞内では、カスパーゼやカルパインの活性化、AIF のミトコンドリアから細胞質への漏出、P53 の活性化が起こり細胞死が誘導される。

### 免疫染色と TUNEL 法

NMDA 眼内投与 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 時間後に眼球の 10  $\mu$ m の凍結切片を作成し TUNEL を行った (ApopTag Fluorescein In Situ Apoptosis detection kit, Chemicom)。免疫染色には、IL-1 $\beta$  (Pierce Biotechnology), TNF $\alpha$  (Pierce), GFAP (Sigma), CD11b (Serotec), TUJ-1 (Covance) を一次抗体として使用した。

### 網膜初代培養

6-8 週の成体マウスを使用した。マウス網膜をパパイインを含んだ溶液で 20 分間 37 度インキュベーションし、ピペッティングで神経細胞の単離を行った。細胞を 8 well の各ウェルに  $4 \times 10^5$  cells で播種した。培地は Neurobasal A に抗酸化剤を除去した 5% B27 sup-

plement を使用した。播種 24 時間後に、細胞を固定し  $\beta$ III tubulin 陽性の網膜神経節細胞を計測した。

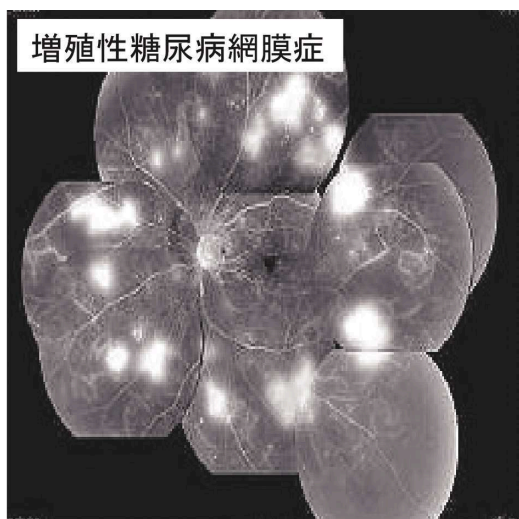
## 結 果

### Pitavastatin の神経保護作用

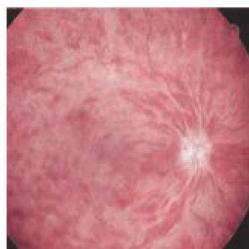
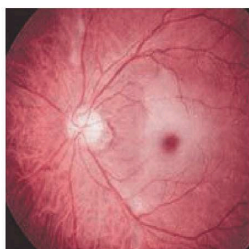
Pitavastatin を 4 日間前投与し NMDA を眼内に投与すると、フルオロゴールドで逆行性に染色された網膜神経節細胞密度は有意に保護された。また、NMDA により網膜神経節細胞とアマクリン細胞において見られた TUNEL 陽性細胞は、スタチンの投与により有意に減少した。以上よりスタチンは NMDA 障害に対し神経保護作用を有することが判明した。

### スタチンの神経保護作用の機序：白血球遊走阻害

Pitavastatin は脳血液関門を殆ど通過しない薬剤で



網膜中心動脈閉塞 網膜中心静脈閉塞



緑内障(乳頭循環障害)

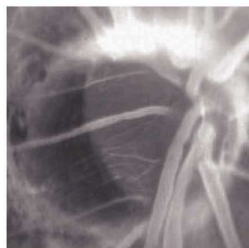
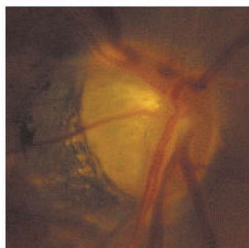


図2. 慢性虚血を伴う眼疾患  
慢性虚血を伴う眼疾患として、糖尿病網膜症、網膜中心動脈閉塞症、緑内障などがある。

ある。そこで、経口投与ではスタチンのもつ神経保護作用は血管内で起こると仮定した。NMDAを眼内に投与すると、炎症性サイトカインである  $IL-1\beta$  がアストロ細胞から、 $TNF\alpha$  がマイクログリアや神経細胞から分泌されていた。しかしスタチンの投与有無では、その炎症性サイトカインの発現は変化しなかった。一方、NMDAにより3時間から9時間後をピークに網膜静脈に白血球が集積し、その変化をスタチンは有意に減少させた。更に白血球血管内皮接着分子の P-selectin

や ICAM-1 を有意に減少させたことから、スタチンは NMDA による白血球遊走を阻害していることが示された。

#### 網膜内遊走白血球による網膜神経節細胞死

網膜内に遊走した白血球が網膜神経節細胞死に直接関与しているかを調べるために、ICAM-1 の受容体である CD18 のノックアウトマウスに NMDA 障害を誘導した。その結果、野生型マウスと比較して、CD18 ノックアウトマウスは NMDA 障害が減弱することが判明した。また、ICAM-1 の中和抗体を血中投与しても、白血球の遊走は抑制され、網膜神経節細胞死は減少したことから、網膜内に遊走した白血球は網膜神経節細胞死に直接関与していることが示された。

#### 考 案

スタチンは臨床で高脂血症治療薬として使用されているが、その広い薬理作用が証明されている。緑内障有病率がスタチン内服群では有意に低いという報告や<sup>7)</sup>、緑内障患者でスタチンを内服したところ、緑内障の進行が有意に抑制されたという報告もある<sup>3)</sup>。本研究では、スタチンは NMDA による網膜内の慢性炎症を変化させることなく、白血球遊走を抑制することにより、神経保護効果を発揮していることが証明された。これまでの、神経細胞の NMDA 受容体を介した細胞内カルシウムの上昇に引き続く直接的な細胞死とは別のグリア細胞と白血球遊走を介した間接的な神経細胞障害が明らかになった (図3)。

#### 結 語

虚血障害を伴う多くの網膜疾患において、炎症の抑制、白血球の遊走阻害も神経保護治療のターゲットとして重要である。スタチンはその候補として挙げることが出来る。

稿をおえるにあたり、研究のご指導を賜りました東北大学眼科学教室西田幸二教授、および研究をお手伝いいただいた高橋秀肇先生をはじめとする東北大学眼科学教室の先生方に心より御礼申し上げます。

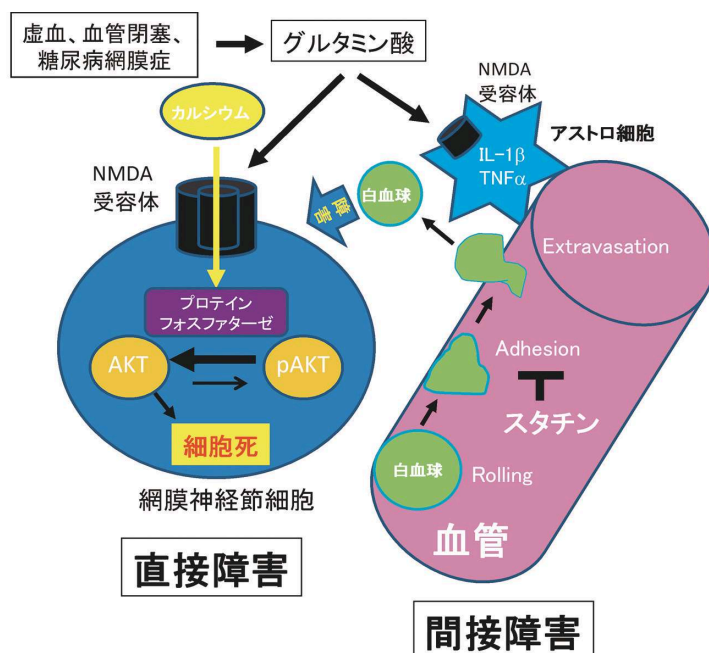


図3. NMDAによる網膜神経節細胞死の直接、間接経路

NMDAによる網膜神経節細胞死の経路には、神経細胞のNMDA受容体を介した直接障害と、炎症の結果起こる遊走白血球による間接障害を認める。

## 文 献

- 1) Ambati, J., Chalam, K.V., Chawla, D.K., et al. (1997) Elevated gamma-aminobutyric acid, glutamate, and vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Arch. Ophthalmol.*, **115**, 1161-1166.
- 2) Bertram, K.M., Bula, D.V., Pulido, J.S., et al. (2008) Amino-acid levels in subretinal and vitreous fluid of patients with retinal detachment. *Eye*, **22**, 582-589.
- 3) De Castro, D.K., Punjabi, O.S., Bostrom, A.G., et al. (2007) Effect of statin drugs and aspirin on progression in open-angle glaucoma suspects using confocal scanning laser ophthalmoscopy. *Clin. Experiment. Ophthalmol.*, **35**, 506-513.
- 4) Deng, J., Wu, D.Z. and Gao, R. (2000) Detection of glutamate and gamma-aminobutyric acid in vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Yan Ke Xue Bao*, **16**, 199-202.
- 5) Lam, T.T., Siew, E., Chu, R., et al. (1997) Ameliorative effect of MK-801 on retinal ischemia. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, **13**, 129-137.
- 6) Lu, M.J., Pulido, J.S., McCannel, C.A., et al. (2007) Detection of elevated signaling amino acids in human diabetic vitreous by rapid capillary electrophoresis. *Exp. Diabetes Res.*, 39765.
- 7) McGwin, G., Jr., McNeal, S., Owsley, C., et al. (2004) Statins and other cholesterol-lowering medications and the presence of glaucoma. *Arch. Ophthalmol.*, **122**, 822-826.
- 8) Tzschentke, T.M. (2002) Glutamatergic mechanisms in different disease states: overview and therapeutic implications—an introduction. *Amino Acids*, **23**, 147-152.
- 9) Wakabayashi, Y., Yagihashi, T., Kezuka, J., et al. (2006) Glutamate levels in aqueous humor of patients with retinal artery occlusion. *Retina*, **26**, 432-436.
- 10) Zacco, A., Togo, J., Spence, K., et al. (2003) 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors protect cortical neurons from excitotoxicity. *J. Neurosci.*, **23**, 11104-11111.

## 高血圧自然発症ラットの血圧と腎 nitric oxide 合成酵素に対する atorvastatin 長期投与の効果

伊 藤 大 亮

東北大学大学院医学系研究科 内部障害学分野



### はじめに

HMG-CoA 還元酵素阻害薬のスタチンは降圧や腎保護効果を有することが報告されているが<sup>1,2)</sup>、それらの機序については十分に明らかにされていない。近年、血管内皮機能改善作用など、スタチンに様々な薬理作用があることが報告され、これらの作用はコレステロール低下作用とは必ずしも相関しないことから、スタチンの pleiotropic 効果と考えられている<sup>3)</sup>。スタチンの降圧や腎保護効果の機序を明らかにするため、本研究では高血圧自然発症ラット (SHR) の血圧と腎臓における nitric oxide (NO) 合成酵素 (NOS) 発現に対する atorvastatin (ATV) 長期投与の効果を検討した。また、NOS 発現に影響すると予想される Rho/Rho-kinase (ROCK) 系や Akt リン酸化に対する ATV 長期投与の効果も合わせて検討した。

### 方 法

雄 5 週齢の SHR をコントロール群と ATV 群の 2 群に分け、ATV 群には ATV (20 mg/kg) を 8 週間にわたり経口投与した。血圧を tail-cuff 法により 2 週毎に測定し、実験最終日に断頭、採血し、血漿脂質や腎機能パラメーターを測定した。胸部大動脈および腎臓を腎皮質、髄質外層、髄質内層に分けてホモジネートし、それぞれの部位の NOS アイソフォーム (eNOS, nNOS, iNOS)、ROCK 系として RhoA, Rac 1, ROCK-I, ROCK-II および ROCK 活性として ezrin-radixin-moesin (ERM) リン酸化 (Thr567)、更に Akt リン酸化 (Ser473) をイムノブロット法により検討した。

データは、平均値±標準偏差で表記し、危険率 5% 未

満を有意水準とした。

### 結 果

ATV 群の血圧はコントロール群に比べて有意に低下した ( $181 \pm 2$  vs.  $207 \pm 4$  mmHg)。血漿総コレステロール、トリグリセリド、遊離脂肪酸、クレアチニン、尿素窒素は両群間に有意な差はなかった。NOS アイソフォーム蛋白発現のコントロール群での各組織での比較では、内皮型 NOS (eNOS) 蛋白、神経型 NOS (nNOS) 蛋白、誘導型 NOS (iNOS) 蛋白いずれも、腎皮質から髄質外層、髄質内層に向かってより高く発現し、胸部大動脈にも認められた。2 群間の比較では、eNOS 蛋白発現は ATV 群の腎皮質、髄質外層、髄質内層で有意に増強した。nNOS 蛋白発現は ATV 群の髄質外層と髄質内層で有意に増強した。iNOS 蛋白発現は両群間でいずれの部位でも有意な差を認めなかった。

ROCK 系と Akt におけるコントロール群における各組織での比較では、RhoA および ROCK-I と ROCK-II は胸部大動脈に高く発現し、腎では髄質内層、髄質外層、皮質の順で高く発現していた。Rac 1, Akt についても腎では髄質内層、髄質外層、皮質の順で高く発現していた。2 群間の比較では、RhoA 蛋白発現は、ATV 群の胸部大動脈で有意に減少していたが、腎組織では両群間に差がなかった。Rac 1 蛋白発現は胸部大動脈、腎皮質、髄質内層では両群間に差がなく、髄質外層では増強していた。ROCK-I 蛋白発現は、ATV 群の胸部大動脈で有意に減少していたが、腎髄質外層では増強し、腎皮質と髄質内層では両群間に差がなかった。ROCK-II 蛋白発現は、ATV 群の胸部大動脈で有意に減少していたが、腎皮質、髄質外層では増強し、髄質内層では両群間に差がなかった。一方、ROCK 活性としての ERM リン酸化は ATV 群の胸部大動脈と腎各組織いずれにおいても有意に減少していた。また、Akt リン酸化はいずれの組織においても ATV 群が有意に増強していた (表 1)。

表1. 高血圧自然発症ラット (SHR) における NOS アイソフォーム, ROCK 系および Akt リン酸化への atorvastatin 長期投与の影響

	eNOS	nNOS	iNOS	RhoA	Rac1	ROCK-I	ROCK-II	Phospho-ERM	Phospho-Akt
Aorta	⇒	⇒	⇒	↓	⇒	↓	↓	↓	↑
Cortex	↑	ND	⇒	⇒	⇒	⇒	↑	↓	↑
Outer Medulla	↑	↑	⇒	⇒	↑	↑	↑	↓	↑
Inner Medulla	↑	↑	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	↓	↑

ND, 発現を認めず; ⇒ 有意な変化なし; ↑ 有意に増強 ↓ 有意に抑制

## 考 察

本研究では, SHR への8週間の ATV 投与により, 血漿脂質と腎機能パラメータに影響を与えずに, 血圧が低下し, 腎においては eNOS と nNOS 蛋白が増強し, iNOS 蛋白には影響を及ぼさなかったことが明らかになった。また, RhoA, Rac1 および ROCK-I, ROCK-II の発現は低下させずに腎 ROCK 活性を抑制した。これまでスタチンによる腎 NOS 発現への影響についての報告は少ないが, pravastatin (50 mg/kg) の1週間投与によりラット腎 eNOS はむしろ低下したとの報告がされている<sup>4)</sup>。また, ATV (50 mg/kg) の30日間投与により SHR-sp の大動脈と脳組織の eNOS 蛋白が増強したと報告されている<sup>5)</sup>。スタチンによる NOS 増強の機序に関して, 低分子 G 蛋白や Akt の関与が報告されており, ヒト血管内皮培養細胞においてスタチンは Rho を介した eNOS mRNA 安定化により, eNOS 蛋白発現を増強させる<sup>6)</sup>。また, ラット血管平滑筋培養細胞においてスタチンは Akt のリン酸化を介して nNOS 発現を増強するという報告も近年されている<sup>7)</sup>。

## 結 語

ATV 長期投与は SHR の血圧を低下させ, 腎臓における eNOS と nNOS 蛋白発現を増強させ, 腎 ROCK 活性を抑制し, Akt をリン酸化する。ATV の降圧機序として, eNOS と nNOS 蛋白発現増強が関与している可能性があり, eNOS と nNOS 蛋白増強の機序として ROCK 活性抑制と Akt リン酸化の一部関与が考えられる。また, ATV 長期投与により, 降圧効果に加えて腎保護効果にも関与する可能性が示唆される。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたりご指導を賜りました医学系研究科内部障害学分野教授 上月正博先生, 同准教授 伊藤修先生, 同教室の共同研究者の先生方に深謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Strazzullo, P., Kerry, S.M., Barbato, A., et al. (2007) Do statins reduce blood pressure? A meta-analysis of randomized, controlled trials. *Hypertension*, **49**, 792-798.
- 2) Agarwal, R. (2006) Effects of statins on renal function. *Am. J. Cardiol.*, **97**, 748-755.
- 3) Almuti, K., Rimawi, R., Spevack, D., et al. (2006) Effects of statins beyond lipid lowering: potential for clinical benefits. *Int. J. Cardiol.*, **109**, 7-15.
- 4) Varela, M. and Garvin, J.L. (2004) Acute and chronic regulation of thick ascending limb endothelial nitric oxide synthase by statins. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **15**, 269-275.
- 5) Kishi, T., Hirooka, Y., Mukai, Y., et al. (2003) Atorvastatin causes depressor and sympatho-inhibitory effects with upregulation of nitric oxide synthases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.*, **21**, 379-386.
- 6) Laufs, U. and Liao, J.K. (1998) Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J. Biol. Chem.*, **273**, 24266-24271.
- 7) Nakata, S., Tsutsui, M., Shimokawa, H., et al. (2007) Statin treatment upregulates vascular neuronal nitric oxide synthase through Akt/NF- $\kappa$ B pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **27**, 92-98.

## 2 型糖尿病の統合的理解に向けた分子機構の解明

岡 芳 知

東北大学大学院医学系研究科 分子代謝病態学分野



### 1. 糖輸送担体の研究から学んだもの

1980 年代は分子生物学の勃興期であった。1985 年にヒトの glucose transporter（糖輸送担体）の遺伝子配列が Science 誌に報告された<sup>1)</sup>。前年に 3 年間の米国留学から帰国して新しい研究テーマを探していた私は、糖輸送担体を切り口にして糖尿病研究を進めようと考えた。筋肉や脂肪組織での糖利用だけでなく、膵  $\beta$  細胞で血糖値を認識するのも、最初は糖輸送担体のステップであるはずで、インスリン作用障害とインスリン分泌障害を併せ持つことの多い 2 型糖尿病を統合的に理解するにはきわめて魅力的なターゲットと考えたのである。インスリンが糖輸送を促進する脂肪細胞の糖輸送担体は、Science 誌に報告された糖輸送担体ではなく別のタイプであることを指摘した論文は、先駆的な論文として高く評価された<sup>2)</sup>。事実、糖輸送担体にはいくつものアイソフォームがあり、インスリンが糖輸送を促進する脂肪細胞や骨格筋の糖輸送担体は GLUT4、膵  $\beta$  細胞や肝臓では GLUT2 であることが後に明らかにされた<sup>3)</sup>。構造と機能についての解析も進め、糖輸送担体は細胞膜の外側と内側にゲートをもつ一種のグルコース通路であり、内部にはグルコースを特異的に認識する結合部位があり、外側と内側のゲートが交互に開閉して選択的なグルコースの通過を制御しているという「洗濯バサミ」モデル説を提唱した<sup>4)</sup>。しかし、糖輸送のステップを膵  $\beta$  細胞で変化させてもグルコースによるインスリン分泌は変化せず、糖尿病のインスリン分泌障害の原因を糖輸送担体に求めることは無理であることも明らかとなった<sup>5)</sup>。

### 2. グルコキナーゼ遺伝子とミトコンドリア遺伝子異常による糖尿病：インスリン分泌障害による糖尿病

90 年代に入ると、PCR の普及によって糖尿病患者での遺伝子解析が 1 研究室レベルで可能となった。うまい具合に、グルコキナーゼやミトコンドリア遺伝子の異常患者を見出すことができ、これらの診断と病態の解明に貢献した<sup>6,7)</sup>。ミトコンドリア遺伝子異常による糖尿病との出会いは、私が膵  $\beta$  細胞量の異常による糖尿病に興味をもつ契機となった。というのは、ミトコンドリア遺伝子異常による糖尿病の剖検例では、膵  $\beta$  細胞数が減少していたからである（当時虎ノ門病院の小林哲郎博士、現山梨大学第 3 内科教授）との共同研究）。そして、ミトコンドリア遺伝子異常では、膵  $\beta$  細胞のグルコースからの ATP 産生が低下するというシグナル伝達障害（機能の異常）と、膵  $\beta$  細胞そのものがアポトーシスで減少する（量の異常）という 2 点で、インスリン分泌障害をきたすと考えた<sup>8)</sup>。

### 3. Wolfram 症候群原因遺伝子のクローニング：小胞体ストレスによる膵 $\beta$ 細胞アポトーシスに関わる糖尿病

1994 年に山口大学第 3 内科に転任して、1998 年には糖尿病をきたす遺伝疾患である Wolfram 症候群の原因遺伝子をクローニングすることに成功した。これは、日本人家系を中心とした家系の遺伝子解析 positional cloning を行った、山口大学第 3 内科の俊英、井上寛（現徳島大学准教授）、谷澤幸生（現山口大学教授）らの成果である<sup>9)</sup>。この疾患では膵  $\beta$  細胞が減少して糖尿病を発症する。ミトコンドリア遺伝子異常による糖尿病に続いて、またしても膵  $\beta$  細胞が減少したための糖尿病である。

WFS1 と名づけた原因遺伝子の機能は当初不明であったが、小胞体の膜蛋白をコードしていること、この欠失により膵  $\beta$  細胞の小胞体ストレスが増加し、アポトーシスにより徐々に数が減少して糖尿病を発症す



ることをノックアウトマウスも作成して証明した<sup>10-12)</sup>。そして、「小胞体ストレスによる膵 $\beta$ 細胞数の減少」は、ウオルフラム症候群に限らず、多くの2型糖尿病にも通じることではないかと考えはじめた。特に、飽食・運動不足時代にはインスリン分泌を増やさなければならず、膵 $\beta$ 細胞の小胞体ストレスは増加するからである。ウオルフラム症候群を切り口にして、膵 $\beta$ 細胞と小胞体ストレスの研究を進めたが、国内の糖尿病学の中ではそれほど理解を得られなかったと思う。

#### 4. 2型糖尿病で膵 $\beta$ 細胞数減少の報告

追い風が吹いてきたのは、2003年、「2型糖尿病患者の剖検例での膵 $\beta$ 細胞量の減少」という報告である<sup>13)</sup>。同様の報告がわが国からも韓国からもなされた<sup>14,15)</sup>。さらに、ヒト2型糖尿病患者の膵 $\beta$ 細胞では、小胞体ストレスが亢進していることに合致する報告がなされた<sup>16)</sup>。

#### 5. 2型糖尿病と小胞体ストレス

2型糖尿病は進行性疾患である。この背景にはインスリン分泌能の進行性低下があることはよく知られている<sup>17)</sup>。私は、当初は、2型糖尿病で見られるインスリン分泌能の進行性の低下は、個々の膵 $\beta$ 細胞の機能が徐々に低下していることの反映だと考えていた。ところが、ミトコンドリア遺伝子異常による糖尿病、小胞体ストレスによる膵 $\beta$ 細胞が減少するウオルフラム

症候群に出会ったことが契機となって、「膵 $\beta$ 細胞の数の低下が2型糖尿病の主因、これに小胞体ストレスが深く関わる」と考え、これに賭けてみようと考えた。以来、ウオルフラム症候群を切り口にして膵 $\beta$ 細胞の小胞体ストレスを研究している。最近、教室の石原寿光講師（現日本大学教授）と山口賢医博らは、慢性の小胞体ストレス下で転写因子ATF4により翻訳抑制因子4E-BP1の発現が増加し、蛋白翻訳を抑制して小胞体に流入する蛋白量を少なくすることで、膵 $\beta$ 細胞の小胞体の負荷を軽減させていることを世界で初めて見出した<sup>18)</sup>。私は、人生というマラソンを走る膵 $\beta$ 細胞は、途中で100mダッシュをしてはいけない。マラソン選手が100mを18秒台のペースで走り続けるように、翻訳抑制因子4E-BP1は、膵 $\beta$ 細胞が後でパテないように（アポトーシスにならないように）、オーバーワークをさせないようにしていると解釈している。

もっとも、小胞体ストレス下では蛋白翻訳が低下するので、インスリン含量は低下するし、少なくとも小胞体ストレスの代表例であるウオルフラム症候群マウスでは、1個の $\beta$ 細胞のグルコース刺激でのインスリン分泌も低下する。したがって、小胞体ストレス下でも機能の障害は生じると考えたほうがよいが、数の低下も、2型糖尿病成因の表舞台に出てきたことは確かである。

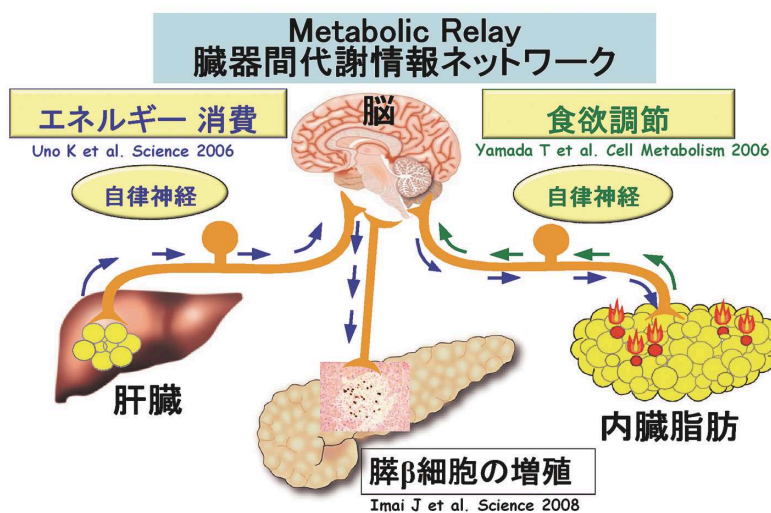


図 1.

## 6. 自律神経系による臓器間代謝情報ネットワーク

インスリン分泌とともに、インスリン作用（インスリン抵抗性）も2型糖尿病の理解・治療には重要である。2001年に山口大学から東北大学へ転任したときに、インスリン作用の研究を個々の細胞、臓器だけではなく、個体全体を対象にしたものに大きく方向を変えることにした。糖尿病や肥満を理解するためには、エネルギー代謝について食欲も含めた個体全体として理解する必要があると考えたのである。これが大きな成果を生み出した。

液性因子による臓器間の代謝情報のやり取りに、自律神経ネットワークも重要な役割を果たしていることを見出したのである。これは共に糖尿病・肥満の研究を進めてきた片桐秀樹教授の慧眼による。そして、それについて困難な実験を切り開いた、石垣泰、山田哲也、今井純太、宇野健司らの努力による。腹腔内脂肪組織に uncoupling protein 1 (UCP 1) を発現させて代謝を変化させると、その代謝情報は自律神経を介して中枢に伝わり食欲を調節する<sup>19)</sup>。また、肝臓に PPAR $\gamma$  を発現させると、肝に脂肪が蓄積し、自律神経を介して中枢にその情報が伝わり、個体全体のエネルギー代謝を高めるとともに、末梢脂肪組織の分解を促進する<sup>20)</sup>。すなわち、脳は液性因子と神経シグナルにより末梢組織の代謝情報を得て、全身の代謝を総合的に制御していると考えられる。我々が見出した臓器間の自律神経系ネットワークは膵 $\beta$ 細胞へも働いて、「2型糖尿病患者での膵 $\beta$ 細胞量の減少」に対しての有力な治療法となりうるのではないかと考え、研究を進めている<sup>21)</sup>(図1)。

## 文 献

- Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S.A., et al. (1985) Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science*, **229**, 941-945.
- Oka, Y., Asano, T., Shibasaki, Y., et al. (1988) Studies with antipeptide antibody suggest the presence of at least two types of glucose transporter in rat brain and adipocyte. *J. Biol. Chem.*, **263**, 13432-13439.
- Bell, G.I., Kayano, T., Buse, J.B., et al. (1990) Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care*, **13**, 198-208.
- Oka, Y., Asano, T., Shibasaki, Y., et al. (1990) C-terminal truncated glucose transporter is locked into an inward facing form without transport activity. *Nature*, **245**, 550-553.
- Ishihara, H., Asano, T., Tsukuda, K., et al. (1994) Overexpression of hexokinase I but not GLUT1 glucose transporter alters concentration dependence of glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cell line MIN6. *J. Biol. Chem.*, **269**, 3081-3087.
- Katagiri, H., Asano, T., Ishihara, H., et al. (1992) Nonsense mutation of the glucokinase gene in late-onset non-insulin dependent diabetes mellitus. *Lancet*, **340**, 1316-1317.
- Katagiri, H., Asano, T., Ishihara, H., et al. (1994) Mitochondrial diabetes mellitus: prevalence and clinical characterization of diabetes due to mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) gene mutation in Japanese. *Diabetologia*, **37**, 504-510.
- Oka, Y., Katagiri, H., Ishihara, H., et al. (1995) Mitochondrial diabetes mellitus-Glucose-induced signaling defects and  $\beta$ -cell loss. *Muscle & Nerve Suppl.*, **3**, 131-136.
- Inoue, H., Tanizawa, Y., Wasson, J., et al. (1998) A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nature Genetics*, **20**, 143-148.
- Takeda, K., Inoue, H., Tanizawa, Y., et al. (2001) WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: Predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 477-484.
- Ishihara, H., Takeda, S., Tamura, A., et al. (2004) Disruption of the WFS1 gene in mice causes progressive beta-cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion. *Hum. Mol. Genet.*, **13**, 1159-1170.
- Yamada, T., Ishihara, H., Tamura, A., et al. (2006) WFS1-deficiency enhances endoplasmic reticulum stress, triggers apoptotic pathway and impairs cell cycle progression specifically in pancreatic  $\beta$ -cells. *Hum. Mol. Genet.*, **15**, 1600-1609.
- Butler, A.E., Jason, J., Bonner-Weir, S., et al. (2003)  $\beta$ -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*, **52**, 102-110.
- Sakuraba, H., Mizukami, H., Yagihashi, N., et al. (2002) Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients. *Diabetologia*, **45**, 85-96.
- Yoon, K.H., Ko, S.H., Cho, J.H., et al. (2003) Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **88**, 2300-



- 2308.
- 16) Laybutt, D.R., Preston, A.M., Akerfeld, M.C., et al. (2007) Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes. *Diabetologia*, **50**, 752-763.
- 17) U.K. Prospective Diabetes Study Group. (1995) U.K. prospective diabetes study 16. Overview of 6 years' therapy of type II diabetes: a progressive disease. *Diabetes*, **44**, 1249-1258.
- 18) Yamaguchi, S., Ishihara, H., Yamada, T., et al. (2008). ATF4-mediated induction of 4E-BP1 contributes to pancreatic  $\beta$  cell survival under endoplasmic reticulum stress. *Cell Metabolism*, **7**, 269-276.
- 19) Yamada, T., Katagiri, H., Ishigaki, Y., et al. (2006) Signals from intra-abdominal fat modulate insulin and leptin sensitivity through different mechanisms: neuronal involvement in food-intake regulation. *Cell Metab.*, **3**, 223-229.
- 20) Uno, K., Katagiri, H., Yamada, T., et al. (2006) Neuronal pathway from the liver modulates energy expenditure and systemic insulin sensitivity. *Science*, **16**, 312, 1656-1659.
- 21) Imai, J., Katagiri, H., Yamada, T., et al. (2008) Regulation of pancreatic  $\beta$  cell mass by neuronal signals from the liver. *Science*, **322**, 1250-1254.

—— The 10<sup>th</sup> International Symposium on Interventional Radiology and New Vascular Imaging. Certificate of Merit ——

## Evaluation of Microporous Covered SENDAI Stent Graft

松橋 俊夫, 佐藤 幸子, 清治 和将, 高澤 千晶  
松永 賢一, 石橋 忠司, 高橋 昭喜

東北大学大学院医学系研究科 量子診断学分野



### はじめに

血管病変に対するステントの有効性が確立されてくるに伴い, 世界中で様々なステントが開発されている。径 6 mm 以下のカバードステントは人工血管として各臓器への血流を保つ役割と, カバー材によるステント外血流の遮断効果から, 大動脈

一次分枝, 二次分枝レベルの動脈瘤の治療に有用ではないかと期待されている。脳動脈瘤の治療はプラチナ製コイルによる瘤の塞栓が主流である。しかし広基性の脳動脈瘤に対してはコイルの逸脱の恐れや再開通しやすいという問題がある<sup>1)</sup>。このような瘤に対し, カバードステントを留置することにより瘤への血流を遮断し, 親血管に狭窄・閉塞を生じない治療法として期待される。またカバードステントは仮性動脈瘤に対する止血効果も期待される。臍頭十二指腸切除術後に生じた肝動脈や胃十二指腸動脈の仮性動脈瘤に対し, コイル塞栓術が施行されてきた<sup>2)</sup>。しかし, 臍頭十二指腸切除後は肝臓への血流が肝動脈に一本化されていることが多いため, 肝動脈を閉塞させることで肝不全を来すことがある。仮性動脈瘤への血流を遮断しつつ, 親血管の血流を保ち, 狭窄率の少ないカバードステントが期待され, 症例報告もされているが<sup>3)</sup>, 従来のカバードステントでは早期にステント閉塞を来し, 肝不全で死亡する例が依然として多い。再狭窄の少ない, 中～小動脈に留置可能な小口径カバードステントの開発が望まれている。近年, カバー材として期待される素材の一つに segmented polyurethane; SPU がある。中山らは dipping 法という手法を用いて, SPU でバルーン拡張型ステントをカバー化した<sup>4)</sup>。SPU で作成したカバー膜である SPU film 表面に多孔化処理を施すことにより, 血管平滑筋細胞が孔を通して血管内腔面に進

入し, すみやかに新生内膜により, ステント内腔面が被覆化され则认为られている。孔の開口率を変化させたカバードステントをビーグル成犬の頸動脈に留置した検討では, 開口率の高い部位では新生内膜肥厚が薄く, 開口率が低い部位では新生内膜肥厚が強かった, という結果を得ている<sup>5)</sup>。さらにウサギ頸動脈瘤モデルを用いた動脈瘤治療実験も行っている<sup>6)</sup>。SPU film の検討はいずれもバルーン拡張型ステントを用いて行われており, 自己拡張型ステントを用いた検討は行われていない。

一方, 東北大学医学部放射線診断科, 東北大学素材工学研究所, 東北工業大学の合同プロジェクトは, ナイチノール製ステントである自己拡張型ステントである SENDAI stent (Piolax, Yokohama, Japan) を開発した (図 1)。今回, 我々は SENDAI stent を SPU film でカバー化し, 狭窄を生じにくい構造, および薬剤のリザーバーとしての機能も有した covered SENDAI stent の開発を試みた。

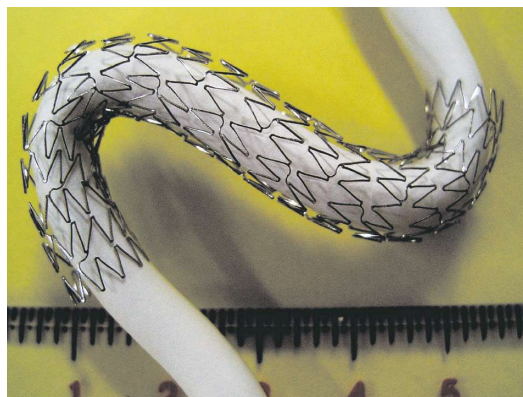


図 1. SENDAI stent

## 方 法

### I. covered SENDAI stent の作成

Dipping 法(図 2)を用い, SPU film により SENDAI stent をカバー化し, さらにエキシマレーザー-KrF excimer laser apparatus (L4500, Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan) で多孔化処理を施した(図 3, 4).

### II. 物理学的特性

カバーしていない bare SENDAI stent (以降ベアセントと表記), covered SENDAI stent 2 種 (thick

type: 厚さ  $60\mu\text{m}$ , thin type: 厚さ  $15\mu\text{m}$ : 図 5) の屈曲時内腔保持力(図 6), 拡張力と支持力(図 7)を測定・比較した。

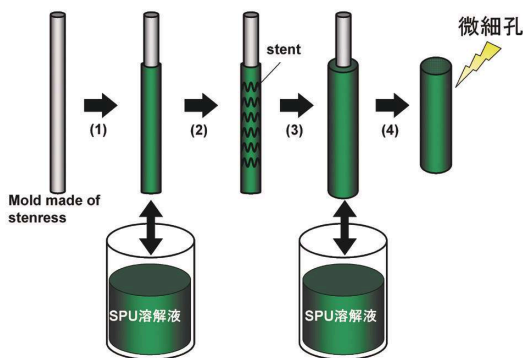


図 2. Dipping 法

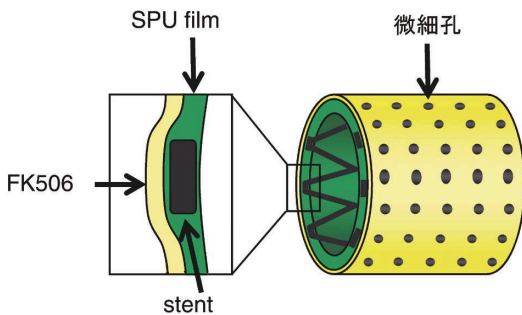


図 3. covered stent の構造

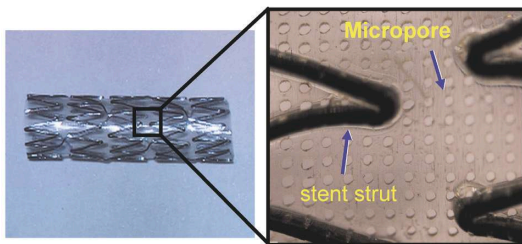
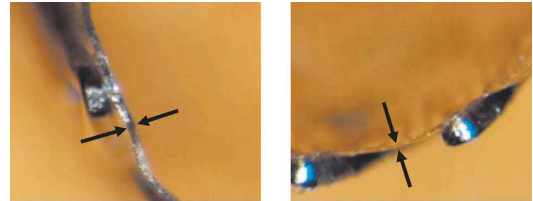


図 4. Micropore の拡大図



(a) thick type  $60\mu\text{m}$   
(b) thin type  $15\mu\text{m}$

図 5. 2 種類の cover 厚

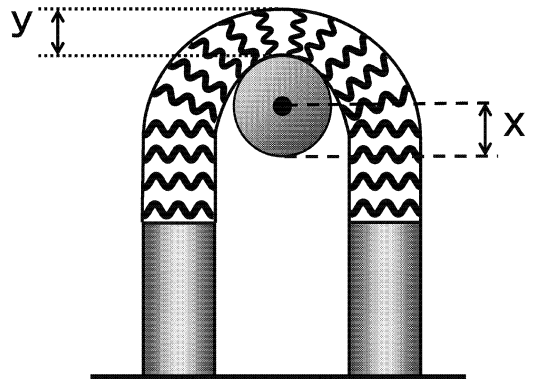


図 6. 屈曲時内腔保持力の測定

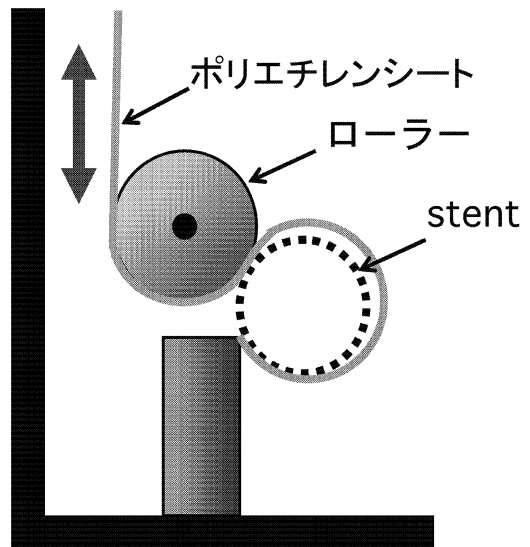


図 7. 拡張力と支持力の測定

### III. 生物学的特性

ベアステント 6 個・薬剤なしの covered SENDAI stent 6 個・免疫抑制剤である FK506 (タクロリムス) を塗布した covered SENDAI stent 6 個をビーグル犬の外腸骨動脈に留置し(表 1), 血管造影を施行した。4 週間後に再度血管造影を行ったのち, 標本を摘出した。各ステントの新生内膜肥厚面積を測定し, 比較した。

## 結 果

SPU film により, カバーの厚さの異なる 2 種類の多

表 1. 留置したステントの数

	Stent 径 6.0 mm	Stent 径 5.5 mm	合計
bare	6	0	6
covered (FK-)	0	6	6
covered (FK+)	1	5	6

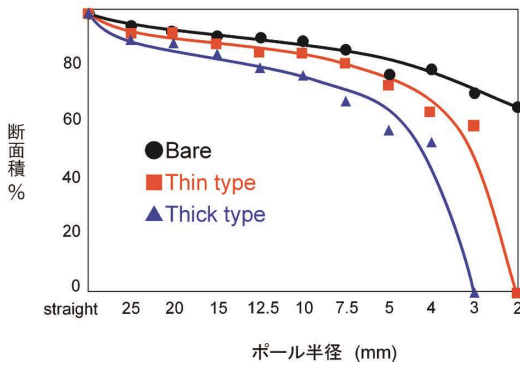


図 8. 屈曲時内腔保持力

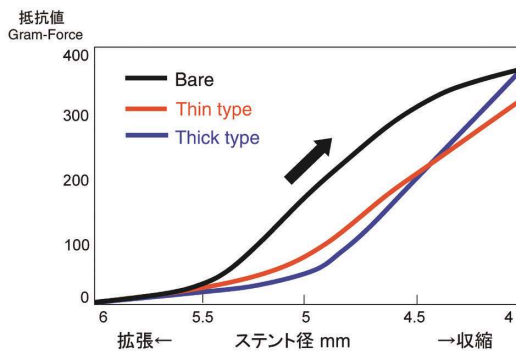


図 9. 支持力

孔化 covered SENDAI stent (thick type, thin type) を作成した (図 5)。

屈曲時内腔保持力はベアステントが最も大きく, 2 種類の covered SENDAI stent では, thin type の covered SENDAI stent の方が thick type の covered SENDAI stent よりも内腔保持力が大きかった (図 8)。

支持力 (図 9) と拡張力 (図 10) は, thick type の covered SENDAI stent が最も支持力が強く, thin type のカバードステントがその次に支持力が強かった。

新生内膜肥厚は薬剤を塗布しない covered SENDAI stent が最も強く, 続いて FK506 を塗布した covered SENDAI stent, ベアステントの順に内膜肥厚が強かった。各群間で有意差を認めた (図 11)。

## 結 論

SPU film を用いた covered SENDAI stent を作成した。covered SENDAI stent は内腔保持力, 拡張力

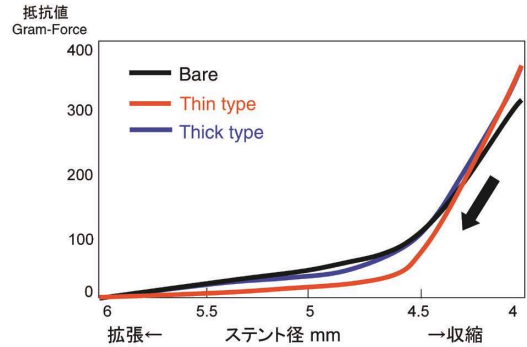
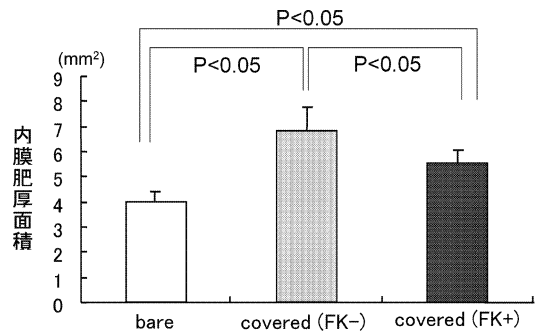


図 10. 拡張力



※ Tukey-Kramer検定

図 11. 4 週間後の新生内膜肥厚

と支持力ともにベアステントと同等の物理学的特性を示した。covered SENDAI stent はベアステントに近い物理学的特性を持つこと、ステントストラットが生体適合性に優れた SPU film により覆われており、ステント内腔面が平坦なこと、SPU film に多数の微細孔が設けられている、という点から、従来のカバードステントよりも内膜肥厚が生じにくい構造を有していると思われる。ステント留置後に生じた新生内膜肥厚は、FK506 を塗布した covered SENDAI stent で新生内膜肥厚抑制を認め、薬物溶出性ステントとしての効果も期待される。

## 文 献

- 1) Soeda, A., Sakai, N., Sakai, H., et al. (2004) Endovascular treatment of asymptomatic cerebral aneurysms: anatomic and technical factors related to ischemic events and coil stabilization. *Neurol. Med. Chir.*, **44**(9), 456-465; discussion 466.
- 2) Reber, P.U., Baer, H.U., Patel, A.G., et al. (1998) Superselective microcoil embolization: treatment of choice in high-risk patients with extrahepatic pseudoaneurysms of the hepatic arteries. *J. Am. Coll. Surg. Mar.*, **186**(3), 325-330.
- 3) Mansueto, G., D'Onofrio, M., Iacono, C., et al. (2002) Gastroduodenal artery stump haemorrhage following pylorus-sparing Whipple procedure: treatment with covered stents. *Dig. Surg.*, **19**(3), 237-240.
- 4) Nakayama, Y., Nishi, S. and Ueda-Ishibashi, H. (2003) Fabrication of drug-eluting covered stents with micropores and differential coating of heparin and FK506. *Cardiovasc. Radiat. Med.*, **4**, 77-82.
- 5) Nakayama, Y., Nishi, S., Ishibashi-Ueda, H., et al. (2000) Surface microarchitectural design in biomedical applications: in vivo analysis of tissue ingrowth in excimer laser-directed micropored scaffold for cardiovascular tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res.*, **51**, 520-528.
- 6) Nishi, S., Nakayama, Y., Ueda-Ishibashi, H., et al. (2003) Occlusion of experimental aneurysms with heparin-loaded, microporous stent grafts. *Neurosurgery*, **53**, 1397-1405.

## ICSI の新たな戦略

### —— IMSI による中心体機能良好精子の選別 ——

長 谷 川 久 隆

東北大学医学部 産婦人科



#### Abstract:

**Objectives:** Current reports examining Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) focused on the selection of sperm based on head morphology. We focused on the shape of the sperm midpiece, which contains the sperm centrosome. We examined whether the sperm with a good centrosomal function was selected by IMSI.

**Methods:** We observed that sperm aster formation after injecting human sperm selected by IMSI into bovine oocytes. We classified sperm two groups by high magnification microscopy. Sperm with straight midpieces were defined as Group A, while those with tapering midpieces were defined as Group B.

**Results:** Group A sperm showed the significantly high sperm aster formation rate in comparison with the group B ( $p < 0.05$ ). Further, group B sperm showed the low sperm aster formation rate in comparison with conventional ICSI ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** This study shows the possibility to improve the sperm aster formation rate by observing the midpiece region using IMSI. It is thought that the sperm with good centrosomal function is selected by the classification of sperm with morphologically straight midpieces using IMSI.

#### 背景と目的

近年、光学ズームで 1,000 倍、さらにデジタルズームを駆使し 6,000 倍という高倍率で精子を観察し、選別した精子を顕微受精（卵細胞質内精子注入法：Intra-

cytoplasmic sperm injection; ICSI）に用いる手法により、着床率が向上し流産率が低下することが報告されている<sup>1,2)</sup>。この手法は Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) と呼ばれる。IMSI に関するこれまでの知見は、空胞の有無などの精子頭部の形態評価を行うことであり、精子中片部の形態評価とその有用性についての詳細な検討は行われていない。

精子中片部には精子中心体が存在する。精子中心体は卵子内に持ち込まれると、放射状に伸びる微小管の束である精子星状体を形成する。雌雄前核の移動と接合は精子星状体によって導かれ、この精子中心体の機能は受精に大きな役割を果たしている。我々は以前より受精における精子中心体機能の発現について、哺乳動物卵子細胞質を用いた精子中心体機能の評価システムにより検討を行ってきた。これは、ウシ卵子内にヒト精子を顕微注入し、一定時間後に固定および免疫染色を行い、精子星状体の形成を確認することで中心体機能を評価するものである<sup>3)</sup>。この測定系を用いて、中片部の形態異常を示す Globozoospermia, Dysplasia of the fibrous sheath: DFS の精子では精子星状体形成率が低く、精子中片部の形態が精子中心体機能の発現に大きく関与していることを報告している<sup>4,5)</sup>。

以上の背景より我々は精子中片部形態に着目し、IMSI により通常の ICSI 時に用いられる 400 倍の観察では選別困難な微細な中片部形態の違いを分類することで、中心体機能が良好な精子を選別できるかを検討した。

#### 方 法

ウシ卵巣より採取した未成熟卵に対して 24 時間の体外成熟培養を行い、MII となった卵子に受精能が確認されているヒト精子をピエゾマイクロマニピュレーターを用いて顕微注入した。

精子は、通常の ICSI に用いる倍率（400 倍）で形態



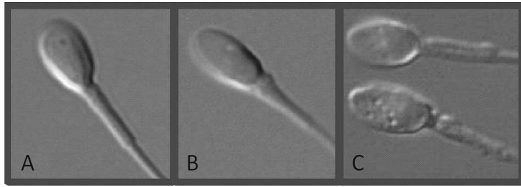


図1. IMSI による精子中片部形態の分類  
A: 中片部がストレートなもの (Group A)  
B: 頸部が太くなっているもの (Group B)  
C: どちらにも含まれないもの (その他)

良好精子として選択したものについて、さらに IMSI に用いる条件(1,000 倍, 微分干渉モジュレーション使用)で詳細に評価し選別した。

IMSI による形態評価の分類として、中片部が真っ直ぐなもの (A 群), 頸部が太いもの (B 群), どちらにも入らないもの (C 群) に分類した (図1)。

注入から6時間後に卵子を固定し, 免疫染色によって精子星状体形成の有無を確認した。

本検討は, 東北大学倫理委員会の承認を受けインフォームドコンセント後行った。

### 結果および考察

ウシ卵子内で精子星状体の形成を確認した (図2)。精子星状体形成率は, A 群精子 (80.5%) が B 群精子 (33.3%) に比較し有意に高い精子星状体形成率を示し ( $p < 0.05$ ), さらに通常の ICSI による精子星状体形成率 (69.6%) と比較しても B 群精子の精子星状体形成率は有意に低率であった ( $p < 0.001$ )。

これらの結果から, 精子中片部形態の微細な差が精子中心体の機能発現に大きな影響を及ぼしており, IMSI による高倍率下での中片部形態の詳細な評価が, 中心体機能良好精子, 即ち受精能良好精子の選別の指標となる可能性が示された。IMSI の導入により生殖補助医療の効率が更に向上することが期待される。

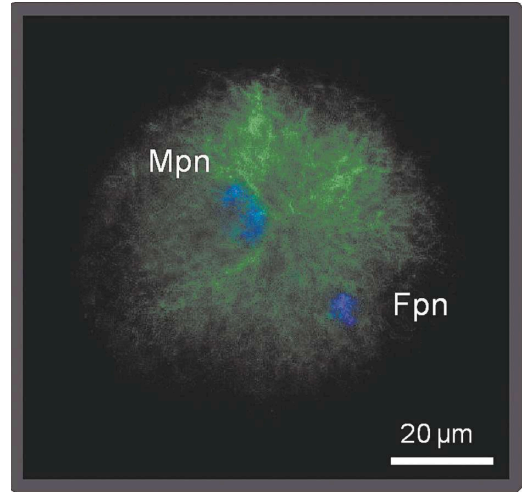


図2. ウシ卵子内における精子星状体形成

■ ; 微小管, ■ ; 染色体  
Mpn ; 雄性前核, Fpn ; 雌性前核

### 共同研究者

寺田幸弘, 宇賀神智久, 高橋藍子, 早坂真一, 立花眞仁, 結城広光, 村上 節, 八重樫伸生, 岡村州博

### 文 献

- 1) Berkovitz, A., et al. (2005) *Hum. Reprod.*, **20**, 185-190.
- 2) Berkovitz, A., et al. (2006) *Hum. Reprod.*, **21**, 1787-1790.
- 3) Terada, Y., et al. (2002) *Fertil. Steril.*, **77**, 1283-1284.
- 4) Nakamura, S., et al. (2002) *Hum. Reprod.*, **17**, 2930-2934.
- 5) Rawe, V., et al. (2002) *Hum. Reprod.*, **17**, 2344-2349.

—— 宮城県対がん協会第 19 回黒川利雄がん研究基金研究助成金賞 ——

## デジタルマンモグラフィのソフトコピー診断の 精度向上に関する研究

鈴木 昭彦

東北大学 腫瘍外科



### 研究目的

マンモグラフィは極めて高い空間分解能が画像に要求されるため、他の医療画像と比較してデジタル化が遅れた分野であった。しかしながら近年では、実地臨床に要求されるレベルを越える機器が開発され、その利便性と相まって急速に普及している。

我が国におけるデジタルマンモグラフィ (DM) 診断は、現在のところデジタル撮影された情報をフィルムにプリントして診断するハードコピー診断が中心であるが、デジタルデータの特徴を最大限に生かすためには、画像情報をそのままモニターに表示して診断を行うソフトコピー診断が有効である。従来から行われてきたスクリーンフィルムマンモグラフィ (SFM) からデジタルマンモグラフィに移行する際にも読影の慣れが必要であることは広く知られているが、デジタルハードコピー診断からソフトコピー診断に移行する際の読影上の影響はほとんど検討された事が無く、近い将来、精度管理上の問題点となる可能性が高い。本研究ではソフトコピー診断へ移行した場合の影響を解析し、今後さらに普及すると予想されるソフトコピー診断時の精度管理のあり方や、診断精度の向上につながる読影方法の確立を目的とする。

### 方法と対象

#### 1. 要精検率の変化

宮城県対がん協会でマンモグラフィ併用検診を受診した女性 (平成 18 年度 33,279 名, 平成 19 年度前期 13,095 名, 平成 19 年度後期 21,563 名) を対象とした。撮影は富士フィルム社製の CR システム (50  $\mu$ m 読み取り) で行い、平成 18 年度はハードコピー診断、平成 19 年度よりソフトコピー診断を行っている。読影の所

見は対がん協会内の読影専用室で行った二次読影の結果を用いた。二次読影は精中委の読影評価が A の者 2 名、または A 一人 B 一人の 2 名組で行い、合議制でカテゴリー判定を行っている。

平成 18 年度、平成 19 年度の二次読影での要精検率を所見分類毎 (腫瘍、石灰化、その他の所見)、カテゴリーを比較し、ハードコピー診断 (平成 18 年度) とソフトコピー診断 (平成 19 年度) の間で現れた傾向を検討した。

### 結 果

#### 1. 要精検率と陽性反応の中度 (PPV) の変化

##### a. 腫瘍 (表 1)

腫瘍と判定され要精査となった症例は、ハードコピー診断ではカテゴリー 3 が 1.25%, カテゴリー 4 が 0.16%, カテゴリー 5 が 0.04% であったのに対し、平成 19 年度通算のソフトコピー診断ではそれぞれ 1.20%, 0.15%, 0.03% となった。いずれも統計学的な有意差はなく、カテゴリー 3 から 5 までの合計でもハードコピー診断で 1.45%, ソフトコピー診断で 1.38% でこれも有意差を認めなかった。

一方癌発見数は平成 18 年度 50 症例, PPV: 10.4% に対して、平成 19 年度は発見数 41 例, PPV: 8.6% であり、ほぼ同様の成績であった。

##### b. 石灰化 (表 2)

石灰化においては、ハードコピー診断のカテゴリー判定 3, 4, 5 はそれぞれ 0.73%, 0.08%, 0.03% であった。一方ソフトコピー診断のカテゴリー判定 3, 4, 5 はそれぞれ 0.59%, 0.05%, 0.02% であり、ソフトコピー診断の方が有意差をもって要精検率が低い傾向であった。カテゴリー 3 から 5 までの合計ではハードコピー診断で 0.84%, ソフトコピー診断で 0.67% であり、有意差を持って ( $p=0.01$ ) ソフトコピー診断が低い要精検率を示した。

石灰化による癌発見数は平成 18 年度の 36 例に対し



表 1. 腫瘍の年度別比較

年度		平成 19 年度 (ソフトコピー)				平成 18 年度 (ハードコピー)			
受診者数		34,658		癌症例		33,279		癌症例	
		数	要精検率	数	PPV	数	要精検率	数	PPV
腫瘍	III	415	1.20%	13	3.1%	416	1.25%	11	2.6%
	IV	52	0.15%	18	34.6%	52	0.16%	28	53.8%
	V	12	0.03%	10	83.3%	12	0.04%	11	91.7%
	合計	479	1.38%	41	8.6%	480	1.45%	50	10.4%

表 2. 石灰化の年度別比較

年度		平成 19 年度 (ソフトコピー)				平成 18 年度 (ハードコピー)			
受診者数		34,658		癌症例		33,279		癌症例	
		数	要精検率	数	PPV	数	要精検率	数	PPV
石 灰 化	III	204	0.59%	15	7.4%	244	0.73%	19	7.8%
	IV	16	0.05%	7	43.8%	28	0.08%	9	32.1%
	V	11	0.02%	7	63.6%	9	0.03%	8	88.9%
	合計	231	0.67%	29	12.7%	281	0.84%	36	12.8%

表 3. その他の所見の年度別比較

年度		平成 19 年度 (ソフトコピー)				平成 18 年度 (ハードコピー)			
受診者数		34,658		癌症例		33,279		癌症例	
		数	要精検率	数	PPV	数	要精検率	数	PPV
そ の 他	III	498	1.44%	18	3.6%	314	0.94%	21	6.7%
	IV	20	0.06%	5	25.0%	26	0.08%	9	34.6%
	V	1	0.003%	1	100%	0	0%	0	-
	合計	519	1.50%	24	4.6%	340	1.02%	30	8.8%

て、平成 19 年度は 29 例と若干の減少がみられたが、PPV では平成 18 年度の 12.8% に対して平成 19 年度では 12.7% と差を認めなかった。

#### c. その他の所見 (表 3)

その他の所見におけるカテゴリー判定は、ハードコピー診断の 3, 4, 5 はそれぞれ 0.94%, 0.08%, 0%, ソフトコピー診断では 1.44%, 0.06%, 0.003% となり、ソフトコピー診断の方が有意に要精検率が高かった。カテゴリー 3 から 5 までの合計ではハードコピー診断で 1.02%, ソフトコピー診断で 1.50% であり、有意差を持って ( $p=0.001$ ) ソフトコピー診断が高い要精検率を示した。

癌発見数は平成 18 年度の 30 例に対し、平成 19 年度では 24 例と若干の減少であったが、PPV に関しては、平成 19 年度の大幅な要精検率の上昇に伴い、平成 18 年度の PPV : 8.8% に対して、平成 19 年度は 4.6% と大きく後退した。

## 考 察

石灰化の検出率の低さに関する考察として、文献的には、ソフトコピー診断の際に偽陰性となりやすい所見として微細石灰化を挙げる報告がある一方で、モニター診断することで微細石灰化のみで見つかる乳がん

の発見率が上昇したとする報告もあり、見解が分かれている<sup>1-3)</sup>。これらの報告はいずれもスクリーンフィルムマンモグラフィ (SFM) とデジタルマンモグラフィ (DM) のソフトコピー診断を比較したもので、本研究の内容 (DM のハードコピー診断とソフトコピー診断の比較) とは異なるため、直接の比較検討に使うことはできないが参考にするべき報告である。検診とは別に行ったソフトコピーの読影実験では、石灰化条件で拡大機能を用いた場合、従来のハードコピー診断診断よりも多い数の石灰化が観察できており、読影方法の周知徹底による精度管理を行うことで、診断精度を確保することは可能である。

SFM との比較では、DM は乳腺内のコントラストを強調するように画質調整が行われるため、高濃度乳腺に対する診断能力は高いと報告されている<sup>4)</sup>。その一方で、強調されたコントラストが腫瘍とまでは認識できない、局所的非対称性陰影 (FAD) と診断される所見を増やす可能性がある。SFM の読影に精通した医師であっても、ソフトコピー診断に移行してすぐの段階では乳がん発見率が若干低くなる傾向も指摘されており、モニター診断にはある程度の習熟過程が必要であるとされている。

## 結 語

公的施策として行う「対策型のがん検診」は、死亡率減少効果の科学的根拠が明確であることが前提とされ、WHO の提言にも示されている。乳癌死亡率を減少させるためには、「有効な検診」を「正しく行う」ことが必要である。「有効な検診」とは、「死亡率減少効果を示した科学的根拠」を有する検診であり、現在、世

界中でこの根拠を示しているのはマンモグラフィによる乳癌検診のみである。一方、「正しく行う」とは、がん検診の実施に関わる精度管理 (がん検診の事業評価) を徹底することであり、この精度が保証されなければ有効な検診とはなり得ない。マンモグラフィ検診のデジタル化は必然の道筋であり、この利点を最大限に発揮できるソフトコピー診断法の確立は、我が国の乳癌検診の精度向上に多に貢献するものであり、今後も研究を継続し成果をあげてゆきたい。

## 文 献

- 1) Skaane, P., Skjennald, A., Young, K., et al. (2005) Follow-up and final results of the Oslo I study comparing screen-film mammography and full-field digital mammography with soft-copy reading. *Acta. Radiologica.*, **7**, 679-689.
- 2) Skaane, P., Hofvind, S. and Skjennald, A. (2007) Randomized trial of screen-film versus full-field digital mammography with soft-copy reading in population-based screening program: follow-up and final results of Oslo II study. *Radiology Sep.*, **244** (3), 708-717.
- 3) Del, Turco, M.R., Mantellini, P., Ciatto, S., et al. (2007) Full-field digital versus screen-film mammography: comparative accuracy in concurrent screening cohorts. *AJR Am. J. Roentgenol. Oct.*, **189** (4), 860-866.
- 4) Pisano, E.D., Gatsonis, C., Hendrick, E., et al. (2005) Diagnostic Performance of Digital versus Film Mammography for Breast-Cancer Screening. *New England Journal of Medicine*, **353**, 1773-1847.

—— ノバルティス 老化および老年医学研究基金 2008 年度（第 22 回）研究助成 ——

## 新規ドラッグガスデリバリーシステムによる 高齢者肺炎予防法の研究

海 老 原 覚

東北大学病院 老年科  
東北大学加齢学研究所 加齢老年医学研究分野



### はじめに

これまでの誤嚥に対する薬物療法は誤嚥のリスクのある人に薬を内服させるというある意味矛盾を含んでいる方法であり、また非常に ADL・意識レベルの悪いひとには用いることができない。そこで非常に ADL・意識レベルの悪くてとても経口の方法がとれないような高齢者にたいする摂食・嚥下改善法として嗅覚刺激による方法を考案した。きっかけは、介護保険施設の職員から聞いた話であった。食欲の無い入所者のラーメンに胡椒をかけてあげたら食が進んだ、という話を聞いて我々は研究を進めた。

### 黒コショウ匂い刺激による嚥下反射改善

まず黒コショウ嗅覚刺激によって誤嚥と関係のある

脳血流低下部位の脳血流を回復させることができることを発見した（図 1）。高齢施設入所者を任意に 3 群にわけ黒胡椒群、ラベンダー群、臭いなし群に振りわけた。それぞれ黒胡椒精油、ラベンダー精油、なにもつけないヌエットによって毎食前一分間の嗅覚刺激を一ヶ月間行った。嗅覚刺激介入の前後で嚥下反射、咳反射（クエン酸法）、末梢血中のサブスタンス P 濃度を測定した（図 2）。嗅覚刺激の前後で嚥下反射を測定し比較したところ、ブラックペッパー刺激により嚥下反射が著明に改善した<sup>1)</sup>。同時に血液中のサブスタンス P 濃度も有意に上昇した。ラベンダー投与群、コントロール群ではこのようなことはなかった。この黒コショウ匂い刺激によるアロマセラピーはどんな状態の悪い患者にも行えるので非常に有望な摂食・嚥下障害治療法・誤嚥性肺炎予防法であると思われた。

この黒胡椒匂い刺激は非侵襲的でどんな状態の患者にも使用でき、また副作用などはみあたらない。脳卒中後で意識レベルの低い患者、重度の嚥下障害患者にはこの黒胡椒匂い刺激により嚥下能力を改善し、経口

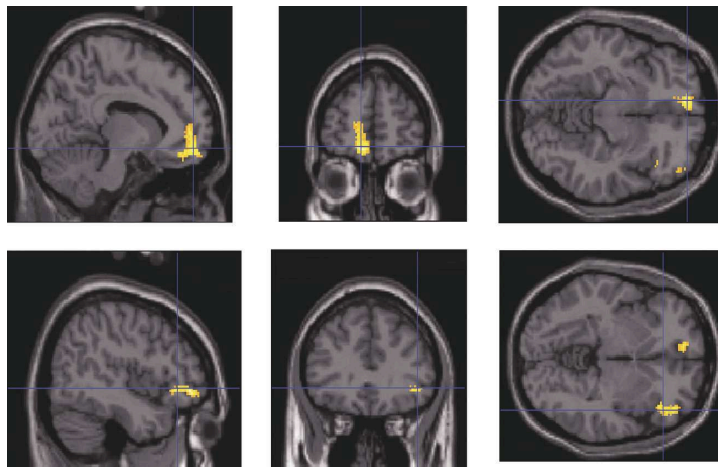


図 1. ブラックペッパー匂い刺激は摂食・嚥下障害患者の前帯状回と島の血流を改善する。

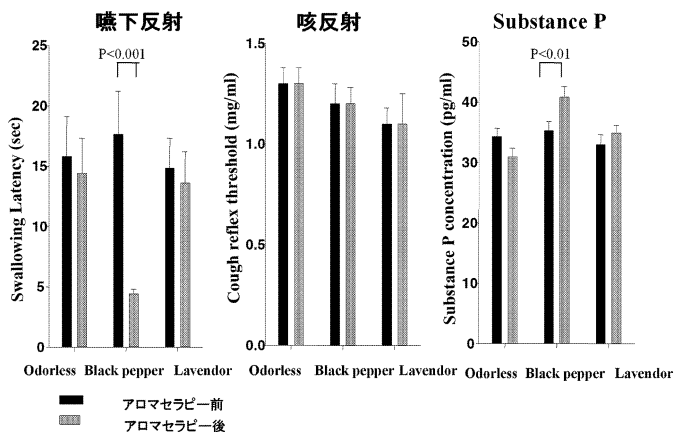


図2. ブラックペッパー匂い刺激は血清サブスタンス P 濃度を上昇させ、嚥下反射を改善する。

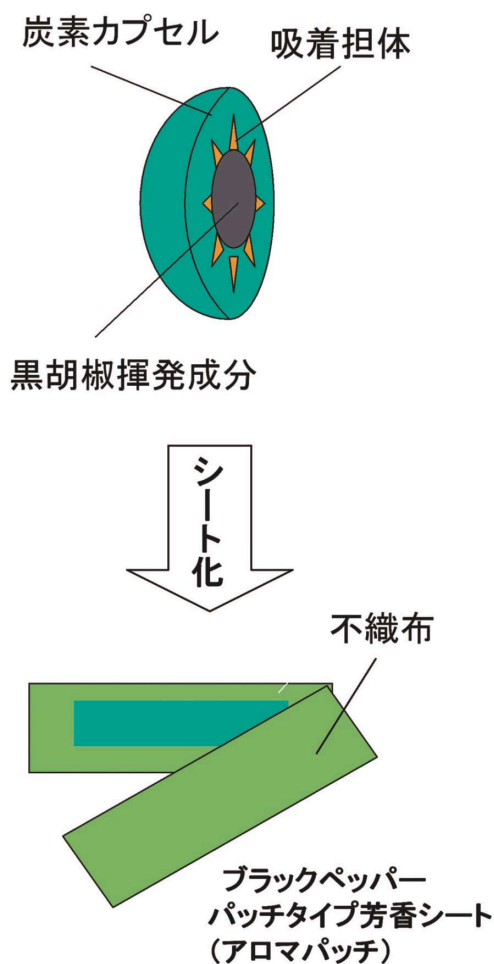


図3. ブラックペッパー匂い刺激を介護者の負担なく行うための新規ドラッグガスデリバリーシステム（アロマパッチ）の開発。

摂取までもってく試みは有用である。

### 新規ナノ粒子ドラッグデリバリーシステム

しかしながら、精油を利用した匂い刺激は面倒で介護者の負担増加を招く。そこで我々は、ブラックペッパー精油の芳香成分を吸着担体に吸着させそれを炭素カプセルにくるむことにより、24時間連続して成分をターゲットまで輸送する新規ドラッグガスデリバリーシステムを開発した（ブラックペッパーアロマパッチ）（図3）。これを使うことにより一日1回のパッチシートの張替えで恒常的に安定してブラックペッパー精油の芳香成分により嗅覚刺激を行うことが出来るようになった。効果はブラックペッパー精油による直接刺激とほとんど差異は見られなかった。

### おわりに

重症の誤嚥性肺炎の患者が入院したときは基本的に絶食である。抗生剤などの治療により患者さんが回復したとき、食事を開始する過程が実は誤嚥性肺炎の治療において持っても重要でかつチャレンジングなステップである。そこで私どもは黒コショウの匂い刺激を利用した食事開始プロトコルを立案している。こういったプロトコルは誤嚥性肺炎の絶食からの食事開始時のみならず、すべての摂食・嚥下障害の摂食訓練やリハビリテーションに応用できるものと思われる。

文 献

- 1) Ebihara, T., et al. (2006) A randomized trial of olfactory stimulation using black pepper oil in older people with swallowing dysfunction. *J. Am. Geriatr. Soc.*, **54**, 1401-1406.

## FKBP12.6 ノックアウトマウスではブドウ糖刺激 インスリン分泌が低下する

吉 川 雄 朗

東北大学大学院医学系研究科 先端再生生命科学寄附講座（現：機能薬理学分野）



**Abstract :** An increase in the cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) is essential for glucose-induced insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cells. This increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  is achieved by not only  $\text{Ca}^{2+}$  influx from extracellular sources but also  $\text{Ca}^{2+}$  release from intracellular stores.

Cyclic ADP-ribose (cADPR), synthesized from  $\text{NAD}^+$  in pancreatic  $\beta$ -cells after glucose stimulation, elicits  $\text{Ca}^{2+}$  release from the endoplasmic reticulum (ER) through ryanodine receptors (RyRs) and thereby induces insulin secretion. Recently, it was demonstrated that cADPR activates RyR through binding to FK506-binding protein 12.6 (FKBP12.6), an accessory protein of RyR, in *in vitro* experiments using purified microsomes of pancreatic islets. Here, we generated FKBP12.6-deficient (*FKBP12.6*<sup>-/-</sup>) mice to elucidate whether FKBP12.6 is physiologically involved in glucose-induced insulin secretion.

*FKBP12.6*<sup>-/-</sup> mice developed normally. These mice, however, showed impaired glucose tolerance coupled to an insufficient increase in the plasma insulin levels upon glucose challenge, without insulin resistance. Pancreatic islet morphology of *FKBP12.6*<sup>-/-</sup> mice was normal, and there were no differences in the islet number,  $\beta$ -cell mass, and insulin content between *FKBP12.6*<sup>-/-</sup> and wild-type mice. In isolated islets, glucose-induced insulin secretion was reduced by more than half in *FKBP12.6*<sup>-/-</sup> islets compared with wild-type controls. Insulin secretion induced by sulfonylureas or KCl, which evoke  $\text{Ca}^{2+}$  influx from extracellular

sources and induce insulin secretion, was, however, unaffected in *FKBP12.6*<sup>-/-</sup> islets. There was no difference in the rate of glucose oxidation between *FKBP12.6*<sup>-/-</sup> and wild-type islets, indicating that glucose uptake and its metabolism were not impaired in *FKBP12.6*<sup>-/-</sup> islets.

These results indicate that FKBP12.6 is physiologically involved in glucose-induced insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cells at the level downstream of glucose metabolism, but not in insulin secretion induced by  $\text{Ca}^{2+}$  influx from extracellular spaces.

### 背 景

膵ランゲルハンス島(ラ島) $\beta$ 細胞からのブドウ糖刺激インスリン分泌には細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) の上昇が必要であり、従来より細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  の流入により説明されてきた<sup>1)</sup>。これは  $\beta$ 細胞内でのブドウ糖代謝により生じたATPが $\text{K}_{\text{ATP}}$ チャンネルを閉鎖し、その結果生じた細胞膜の脱分極により電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルが開いて細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  が流入し、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  が上昇することでインスリン分泌が誘導されるというものである。これに加え、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ストアである小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  動員もブドウ糖刺激インスリン分泌に重要であると考えられており、我々は「CD38-cADPR情報伝達系」という新規のインスリン分泌経路を明らかにしてきた<sup>2)</sup>。この系ではブドウ糖代謝により生じたATPがcADPRの合成酵素であるCD38の酵素活性を調節し、その結果細胞内に増加したcADPRが小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出を起こして、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  が上昇しインスリン分泌を誘導するというものである。最近我々はcADPRが小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  動員を誘導する際に、小胞体2型リアノジン受容体  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル(RyR2)の調節サブユニットであるFKBP12.6に結合し、RyR2からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出を起こしている可能性を単

離ラ島小胞体を用いた *in vitro* の系で示した<sup>3)</sup>。そこで FKBP12.6 が実際のインスリン分泌に関与していることが考えられたため、FKBP12.6 ノックアウトマウスを作製し、*in vivo* の系で解析を行った。

## 結果・考察

KO マウスは胚性幹細胞での相同組換え法を用いて作製した。KO マウスは正常に出生し、野生型マウスと同様に発育した。

KO マウスの随時・空腹時の血糖値・血漿インスリン値は正常であった。しかし、ブドウ糖負荷試験を行ってみると KO マウスの血糖値は野生型と比較し有意に上昇しており耐糖能異常が認められた (Fig. 1A)。またその時の血漿インスリン値は有意に低下していた (Fig. 1B)。一方インスリン負荷試験では KO マウスにインスリン抵抗性は見られず (Fig. 1C)、KO マウスに見られた耐糖能異常はインスリン分泌不全によると考えられた。

次にラ島の組織学的解析を行ったところ、KO マウスのラ島の構築は正常であった (Fig. 2A)。またラ島の数・大きさにも異常は認められず (Fig. 2B・2C)、膵インスリン含量・ラ島インスリン含量も両群間で差は認められなかった (Fig. 2D・2E)。以上のことから KO マウスのインスリン分泌不全はラ島の発生・分化異常やインスリン不足ではなく、インスリン分泌機構に障害があることによると考えられた。

そこで先ずインスリン分泌に関わる主要な因子の発現量を real-time RT-PCR 法で検討した。その結果  $K_{ATP}$  チャンネルを構成する Sulfonylurea receptor 1 (SUR1) と CD38, RyR2 の mRNA 量が野生型と比較して KO ラ島で優位に減少していることが明らかとなり、KO ラ島では  $K_{ATP}$  チャンネルおよび CD38-

cADPR 情報伝達系の構成因子が減少している可能性が考えられた。

また  $\beta$  細胞でのブドウ糖代謝異常はインスリン分泌不全の原因となるため、KO ラ島におけるブドウ糖代謝異常について  $[U-^{14}C]$ -グルコースを用いたブドウ糖酸化率の測定にて検討した。低濃度・高濃度ブドウ糖刺激によるブドウ糖酸化率は両群間で差はなく、KO ラ島内でブドウ糖は正常に代謝されているものと考えられた。

次に単離ラ島を用いた *in vitro* の系でインスリン分泌を測定した。低濃度ブドウ糖刺激 (2.8 mM) での基礎インスリン分泌量は両群間で差を認めなかったが、高濃度ブドウ糖刺激 (10・20 mM) では KO ラ島で著明にインスリン分泌量が低下していた (Fig. 3A)。先に述べた様に KO ラ島ではブドウ糖代謝に異常はないと考えられたので、このインスリン分泌障害は ATP 産生以降の経路に欠陥があると考えられた。一方、 $K_{ATP}$  チャンネルを閉鎖しインスリン分泌を促進するグリベンクラマイド刺激では KO ラ島は正常のインスリン分泌を示した (Fig. 3B)。前述のように SUR1 の mRNA 量は減少していたが、インスリン分泌の障害とはならないと考えられた。また細胞膜の脱分極を起こすことでインスリン分泌を誘導する KCl による刺激でも、KO ラ島は正常のインスリン分泌を示した (Fig. 3B)。従って KO ラ島では  $K_{ATP}$  チャンネルを介する経路は正常であり、それ以外の経路が障害されていると考えられた。

今回作製した KO マウスの表現型は以前我々が報告した CD38 ノックアウトマウスの表現型と極めて類似していた<sup>4)</sup>。CD38 ノックアウトマウスではブドウ糖刺激後のラ島内 cADPR 増加が見られず、ブドウ糖刺激インスリン分泌も障害されていたが、グリベンクラマイド刺激や KCl 刺激によるインスリン分泌は正常

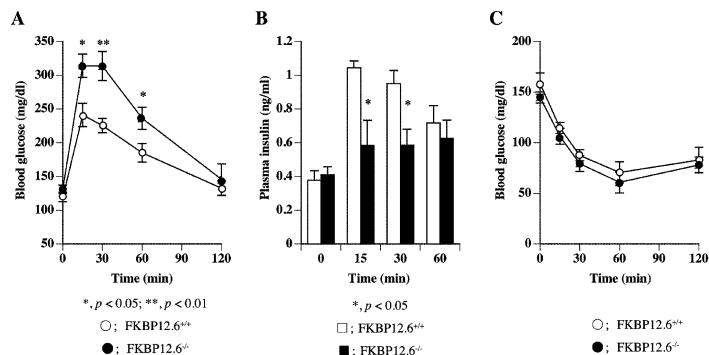


Fig. 1. ブドウ糖負荷試験における血糖値 (A)・血漿インスリン値 (B)、インスリン負荷試験における血糖値 (C) (文献 6 より引用)

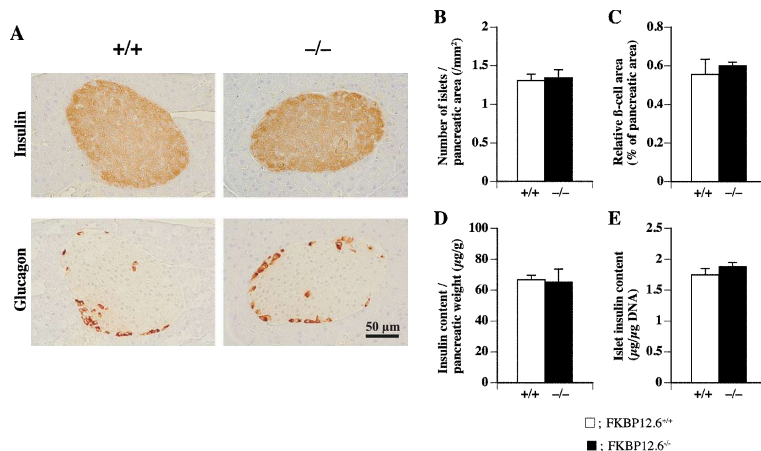


Fig. 2. 膵ランゲルハンス島の組織像 (A), ラ島の数 (B),  $\beta$  細胞の面積 (C), 膵インスリン含量 (D), ラ島インスリン含量 (E) (文献 6 より引用)

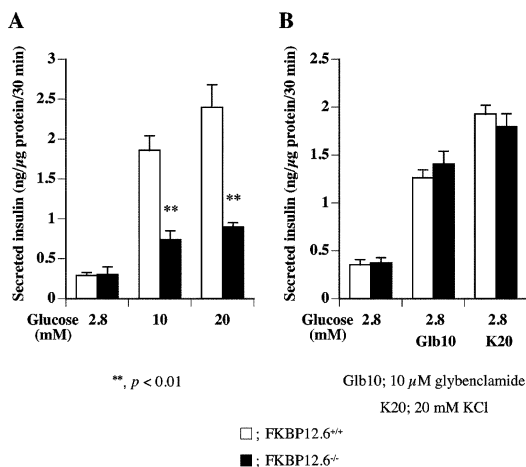


Fig. 3. 単離ランゲルハンス島からのブドウ糖刺激に対するインスリン分泌量 (A), グリベンクラマイドおよび KCl に対するインスリン分泌量 (B) (文献 6 より改編)

であった。その結果 CD38 ノックアウトマウスはインスリン抵抗性を伴わない耐糖能異常を示す。これらの 2 種類のノックアウトマウスの表現型の類似性から KO マウスでも CD38-cADPR 情報伝達系が障害されていることが示唆された。また CD38-cADPR 情報伝達系の主要構成因子である CD38 と RyR2 の mRNA 量が低下していたことから、この情報伝達系に質的異常があることも考えられた。更に我々は FK506 の前処理により FKBP12.6 を外しておいたラ島ミクロソームからは cADPR による  $\text{Ca}^{2+}$  放出が生じないことを既に明らかにしており、また別グループが作成した FKBP12.6 ノックアウトマウスの平滑筋で行われた実

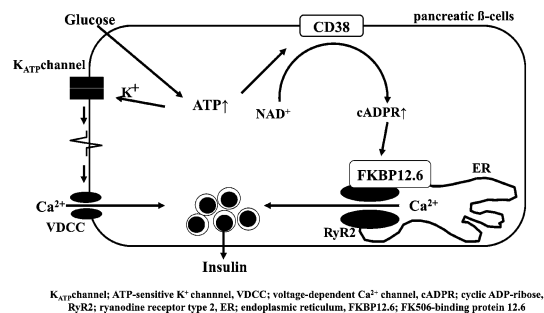


Fig. 4. 膵  $\beta$  細胞のブドウ糖刺激インスリン分泌における CD38-cADPR 情報伝達系

験でも同様の報告がなされている<sup>5)</sup>。以上のことから今回作製した KO マウスでも FKBP12.6 の欠損により cADPR による RyR2 を介した小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出が障害されていることでブドウ糖刺激インスリン分泌が低下していると考えられた。

## 文 献

- 1) Ashcroft, F.M. and Ashcroft, S.J.H. (1992) *Insulin: Molecular Biology to Pathology*, Oxford University Press, Oxford.
- 2) Takasawa, S., Nata, K., Yonekura, H., et al. (1993) Cyclic ADP-ribose in insulin secretion from pancreatic  $\beta$  cells. *Science*, **259**, 370-373.
- 3) Noguchi, N., Takasawa, S., Nata, K., et al. (1997) Cyclic ADP-ribose binds to FK506-binding protein 12.6 to release  $\text{Ca}^{2+}$  from islet microsomes. *J. Biol. Chem.*, **272**, 3133-3136.
- 4) Kato, I., Yamamoto, Y., Fujimura, M., et al.



- (1999) CD38 disruption impairs glucose-induced increases in cyclic ADP-ribose,  $[Ca^{2+}]_i$ , and insulin secretion. *J. Biol. Chem.*, **274**, 1869-1872.
- 5) Wang, Y.X., Zheng, Y.M., Mei, Q.B., et al. (2004) FKBP12.6 and cADPR regulation of  $Ca^{2+}$  release in smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **286**, C538-C546.
- 6) Noguchi, N., Yoshikawa, T., Ikeda, T., et al. (2008) FKBP12.6 disruption impairs glucose-induced insulin secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **371**, 735-740.

—— FCCA, Forum : Carbohydrates Coming of Age (川口基金) ——

## ヘパラン硫酸はマウス膵ランゲルハンス島の形態形成や $\beta$ 細胞増殖, インスリン分泌機能に 重要な役割を果たしている

高 橋 巖

東北大学大学院医学系研究科 先端再生生命科学 (江東微生物研究所) 寄附講座



**Abstract :** Heparan sulfate (HS) binds with several signaling molecules and regulates ligand-receptor interactions, playing an essential role in embryonic development. Here we showed that HS was intensively expressed in pancreatic islet  $\beta$ -cells after 1 week of age in mice. The enzymatic removal of HS in isolated islets resulted in attenuated glucose-induced insulin secretion with a concomitant reduction in gene expression of several key components in the insulin secretion machinery. We further depleted islet HS by inactivating the exostosin tumor-like 3 gene specifically in  $\beta$ -cells. These mice exhibited abnormal islet morphology with reduced  $\beta$ -cell proliferation after 1 week of age and glucose intolerance due to defective insulin secretion. These results demonstrate that islet HS is involved in the regulation of post-natal islet maturation and required to ensure normal insulin secretion.

Key words : heparan sulfate ; Extl3 ; insulin secretion ;  $\beta$ -cell proliferation

### 背 景

ヘパラン硫酸 (HS) は細胞表面・細胞外基質に分布する高分子多糖で, FGF 等の増殖因子や Hedgehog, Wnt 等のモルフォゲンの共役受容体として, そのシグナル伝達を調節することにより, 胎生期の臓器発生・分化に関与することが知られている<sup>1)</sup>. 一方, 成熟組織

での機能については未解明の部分が多く, 膵臓のランゲルハンス島 (ラ島) においても HS の存在・機能はこれまで注目されてこなかった. 本研究では, 免疫染色によりラ島での HS の局在を明らかにし, その機能解析を行った.

### 方法・結果

成獣齢マウスの膵組織を抗 HS 抗体 (3G10 抗体: HS 分解酵素であるヘパリチナーゼにより切断された残存糖鎖を認識する  $\Delta$ HS 抗体) により免疫染色したところ, HS がラ島  $\beta$  細胞に局限して発現していることを見出した (Fig. 1A-F). 週齢を遡って検討した結果, HS は胎生期や出生直後のラ島にはほとんど検出されず, 1 週齢以降のラ島に発現してくることが明らかになった (Fig. 1G). この様な存在様式から HS が生後のラ島成熟やインスリン分泌機能に関与していると考え, 成獣マウスより単離したラ島をヘパリチナーゼで処理した後 (Fig. 2A), インスリン分泌実験を行った. ヘパリチナーゼ処理直後のラ島では, グルコース刺激インスリン分泌は非処理群に対して差がなかったが, 処理後 24 時間経過した時点でのグルコース刺激インスリン分泌は非処理群の 40% にまで低下していた. また KCl 刺激によるインスリン分泌は 77% に低下していた (Fig. 2B). この時のラ島インスリン含量は両群間で差がなく (Fig. 2C), ヘパリチナーゼ処理群でインスリン分泌が障害されていることが示された. 次に, ヘパリチナーゼ処理 24 時間後のラ島より RNA を抽出し, リアルタイム RT-PCR 法によりインスリン分泌機構の主要構成因子の発現を検討した. ヘパリチナーゼ処理群では Glut2<sup>2)</sup>, SUR1<sup>3)</sup>, 分泌顆粒の膜融合に与る Snap25, syntaxin 1a<sup>4-6)</sup> の発現が有意に低下していた (Fig. 2D). 一方, HS 合成酵素<sup>7-9)</sup> の発現は亢進していた (Fig. 2E). 次に, 生体内におけるラ島

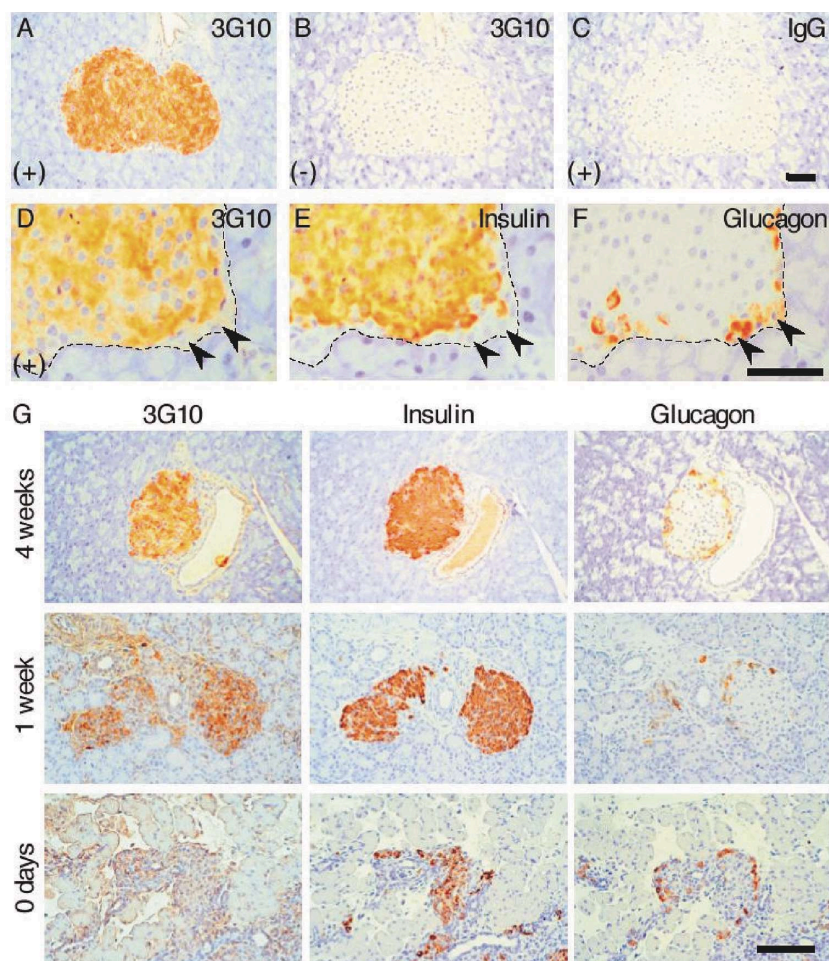


Fig. 1. Immunostaining of HS in pancreatic islets. (A, B) Immunostaining with mAb 3G10 after treating sections with (+) or without (-) heparitinase. (C) Immunostaining with negative control IgG. (D-F) Immunostaining for HS (3G10), insulin, and glucagon at higher magnification. The same cells were indicated by arrowheads. Scale bar, 50  $\mu$ m. (G) Pancreatic sections at indicated ages were analyzed. Scale bar, 100  $\mu$ m.

HSの機能を解析するために、HS合成酵素であるExostosin tumor-like (Ext1) 3遺伝子欠損マウスを作製した。このマウスは胎生致死となり、ラ島での機能解析は不可能であったため、続いてExt13を膵 $\beta$ 細胞特異的に欠損する( $\beta$ Ext13KO)マウスを作製・解析した。 $\beta$ Ext13KOマウスではラ島は正常に発生したが、生後2週以降で $\alpha$ 細胞がラ島内に散在するといった形態異常が認められた (Fig. 3A)。また $\beta$ 細胞増殖が対照ラ島に対して低下しており (Fig. 3B)、結果としてラ島に占める $\beta$ 細胞の割合が減少していた (Fig. 3C)。 $\beta$ Ext13KOマウスより単離したラ島では、ブドウ糖に対するインスリン分泌応答が対照ラ島に対して著明に

低下していた (Fig. 4A)。マウス個体を用いたGTTでは、 $\beta$ Ext13KOマウスでインスリン分泌不全による耐糖能異常が認められた (Fig. 4B-D)。

## 考 察

今回我々はHSが生後1週齢以降にマウスラ島 $\beta$ 細胞で発現してくることを明らかにした。HS分解直後にはラ島のインスリン分泌に変化はなく、24時間後に分泌障害が認められたことから、ヘパラン硫酸はインスリン分泌の維持に関与していると考えられた。また、KCl刺激に比しグルコース刺激時にインスリン分

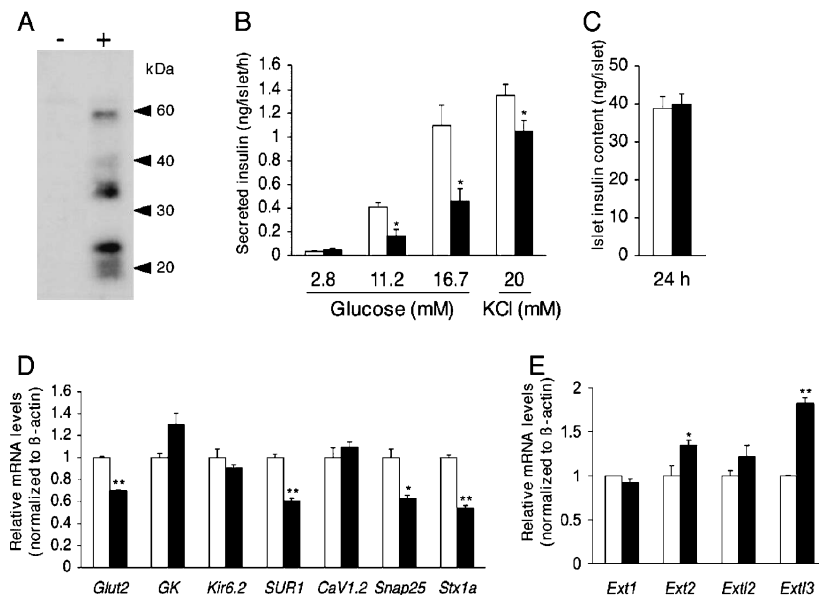


Fig. 2. Insulin secretion and gene expression in isolated islets after heparitinase treatment. (A) After treating either without (-) or with (+) heparitinase, the islets were lysed directly in SDS-PAGE sample buffer and subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting with mAb 3G10. (B) Insulin secretion in response to glucose or KCl after 24 h from heparitinase digestion.  $n=4-5$ . (C) Insulin content in the islets at 24 h after heparitinase digestion.  $n=6-8$ . (D) Relative mRNA levels were determined for the indicated genes with real-time RT-PCR. For each gene, the level of mRNA in islets treated without heparitinase was set to 1. *GK*, glucokinase; *Stx1a*, syntaxin 1A.  $n=3$ . (E) The expression of the *Ext* family of genes.  $n=3$ . Open bars, islets treated without heparitinase; filled bars, heparitinase-treated islets. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

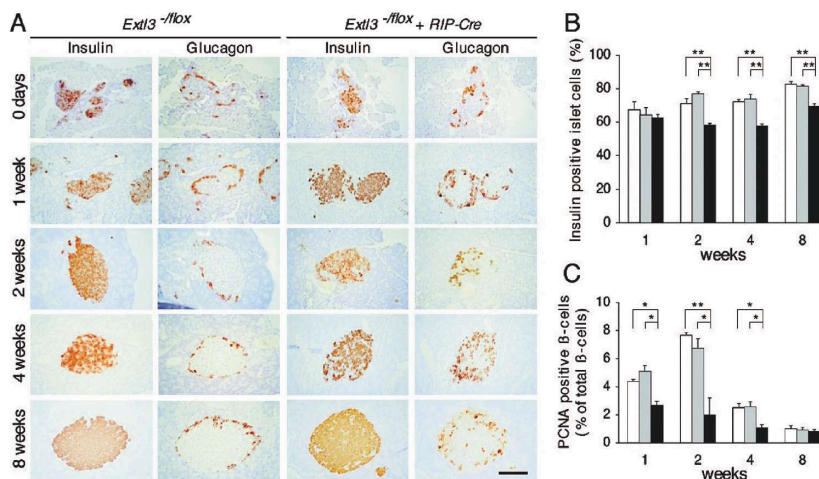


Fig. 3. Immunohistochemical analysis of islets and  $\beta$ -cell proliferating activity. (A) Pancreatic sections at indicated ages were analyzed. Scale bar, 100  $\mu$ m. (B) The proportion of insulin-positive cells to total islet cells. At least five islets were analyzed per pancreas  $n=3-6$ . (C) The proportion of PCNA-positive  $\beta$ -cells to total  $\beta$ -cells. At least five islets were analyzed per pancreas  $n=3-5$ . Open bars, *Extl3*<sup>+/flox</sup>; shaded bars, *Extl3*<sup>-flox</sup>; filled bars,  $\beta$ Extl3KO. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

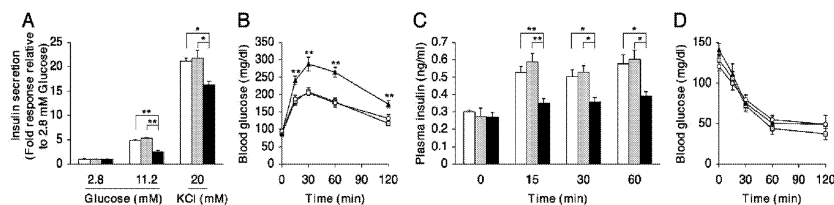


Fig. 4. Insulin secretion in  $\beta$ Extl3KO mice. (A) Insulin secretion from isolated islets. Data were expressed as the insulin secretion relative to basal secretion at 2.8 mM glucose (which was arbitrarily set at 1).  $n=4-5$ . (B) Blood glucose levels during glucose tolerance test. Glucose (2 g/kg of body weight) was injected intraperitoneally.  $n=20-23$ . (C) Plasma insulin levels after injection of glucose (3 g/kg of body weight).  $n=6-11$ . (D) Blood glucose levels after intraperitoneal injection of insulin (0.75 U/kg of body weight).  $n=9-13$ . Open bars and circles,  $Extl3^{+/flox}$ ; shaded bars and squares,  $Extl3^{-/flox}$ ; filled bars and triangles,  $\beta$ Extl3KO. \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ .

泌障害がより強く現れることから、細胞膜の脱分極以降のみならず以前のインスリン分泌経路にも障害があると考えられた。遺伝子発現解析結果はこれに一致するものであり、ヘパラン硫酸はインスリン分泌機構構成因子の発現制御に関与することでインスリン分泌を維持していると考えられた。また $\beta$ 細胞ではヘパラン硫酸合成の制御機構が存在しHSの分布が密に調節されている可能性が考えられた。 $\beta$ Extl3KOマウスの解析により、生後 $\beta$ 細胞に発現してくるHSが、生後の $\beta$ 細胞増殖、ラ島構造、インスリン分泌といったラ島形態・機能の成熟に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

## 結 語

これまでに $\beta$ 細胞に関する研究は数多くなされているが、蛋白質を対象にしたものがほとんどであり、糖鎖であるHSに着目したものは皆無である。本研究によりラ島形成・機能におけるHSの重要性が初めて明らかにされた。このことはラ島HS異常が糖尿病の要因となり得ることを意味し、今後の糖尿病研究にHS障害という新たな観点をもたらすものと期待される。加えて、HSがインスリン分泌能の維持に重要であることから、*in vitro*での機能的 $\beta$ 細胞の作製に際しても、HSが鍵となることが考えられる。

## 文 献

- Lin, X. (2004) Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. *Development*, **131**, 6009-6021.
- Guillam, M.T., Dupraz, P. and Thorens, B. (2000) Glucose uptake, utilization, signaling in GLUT2-null islets. *Diabetes*, **49**, 1485-1491.
- Seghers, V., Nakazaki, M., DeMayo, F., et al. (2000) Aguilar-Bryan, J. Bryan, Sur1 knock-out mice. A model for K(ATP) channel-independent regulation of insulin secretion. *J. Biol. Chem.*, **275**, 9270-9277.
- Chan, C.B., MacPhail, R.M., Sheu, L., et al. (1999) Beta-cell hypertrophy in fa/fa rats is associated with basal glucose hypersensitivity and reduced SNARE protein expression. *Diabetes*, **48**, 997-1005.
- Nagamatsu, S., Nakamichi, Y., Yamamura, C., et al. (1999) Decreased expression of t-SNARE, syntaxin 1, and SNAP-25 in pancreatic beta-cells is involved in impaired insulin secretion from diabetic GK rat islets: restoration of decreased t-SNARE proteins improves impaired insulin secretion. *Diabetes*, **48**, 2367-2373.
- Vikman, J., Ma, X., Hockerman, G.H., et al. (2006) Antibody inhibition of synaptosomal protein of 25 kDa (SNAP-25) and syntaxin 1 reduces rapid exocytosis in insulin-secreting cells. *J. Mol. Endocrinol.*, **36**, 503-515.
- Zak, B.M., Crawford, B.E. and Esko, J.D. (2002) Hereditary multiple exostoses and heparan sulfate polymerization. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1573**, 346-355.
- Kim, B.T., Kitagawa, H., Tamura, J., et al. (2001) Human tumor suppressor EXT gene family members EXTL1 and EXTL3 encode alpha 1,4-N-acetylglucosaminyltransferases that likely are involved in heparan sulfate/heparin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 7176-7181.
- Kitagawa, H., Shimakawa, H. and Sugahara, K. (1999) The tumor suppressor EXT-like gene EXTL2 encodes an alpha1, 4-N-acetylhexosaminyltransferase that transfers N-

acetylgalactosamine and N-acetylglucosamine to the common glycosaminoglycan-protein linkage region. The key enzyme for the chain

initiation of heparan sulfate. *J. Biol. Chem.*, **274**, 13933-13937.



—— 日本神経回路学会研究賞 ——

## 平成 20 年度 日本神経回路学会研究賞を受賞して

坂 本 一 寛

東北大学大学院医学系研究科 生体システム学分野 (現: 東北大学 電気通信研究所)



この度、日本神経回路学会より、電子情報通信学会技術研究報告 (信学技法) NC2007-39「サル前頭前野興奮性細胞・抑制性細胞における行動目標表現の遷移 (坂本一寛, 吉田隼, 虫明元, 斎藤尚宏, 合原一幸, 丹治順)」に対し、平成 20 年度研究賞を賜りました。関係する皆様方には、著者を代表いたしまして、

厚く御礼申し上げます。

行動の計画とは、最終目標を達成するために具体的な目標を定める、創造的な行為です。前頭前野は、そのような創造的な心の働きに関わると考えられています。私どものグループ (東北大学医学部・生体システム生理研究分野 (虫明元教授)) では、ここ数年、迷路課題 (図 1) と呼ばれる課題をニホンザルに学習させ、外側前頭前野の神経活動を記録・解析してきました。迷路課題では、提示された迷路中のゴールまでカーソルをレバー造作で移動させねばなりません。長期の訓練後、課題を遂行中、特に、迷路中の最終ゴールに到達するための順序だった具体的な行動を計画する期間 (行動計画期間) に着目し、神経活動を記録・解析したところ、少なからぬ数の細胞が、行動計画期間に発火頻度の選択性を変える、つまり、行動計画期間の初期で

は、画面上に一時的に提示された最終ゴールの位置に選択的に発火するのですが、実行期が近づくとも 1 手目のカーソル運動方向に選択的に発火するようになることを発見しました。一般に、行動を計画したり問題を解決したりせねばならない状況では、最終目標を達成するために具体的な方策・解法を思いつかなければなりません。このような側面を我々が記録した前頭前野神経細胞は反映しているのではないかと考えております。

私どもは、そのような解析を更に一步進め、上記のタイプの神経細胞を、微小電極から記録される細胞外電位の波形やその細胞の平均発火頻度を元に、興奮性錐体細胞群と抑制性介在細胞群に区別し、両者の性質を比較しました。すると、錐体細胞群は画面上に提示された最終ゴールが消えた後も、持続的に最終ゴール位置に選択的な活動を示した後、1 手目のカーソル方向に選択的な活動へと遷移しました。一方、介在細胞群は、最終ゴールが消えると、一時的に最終ゴールへの選択性が低下した後、1 手目のカーソル方向に選択的な活動へと遷移しました。これが、今回、研究賞をいただいた直接の研究です。このような神経活動が何を意味しているのかは、よくわかりません。しかしながら、脳の神経回路は、興奮性細胞と抑制性細胞からなるネットワークです。前者は比較的長距離に投射し、後者は比較的局所に投射しています。また、近年、*in vitro* の実験により、組織学的に同じタイプの抑制性細胞同士は電気シナプスを介して繋がっていることが明

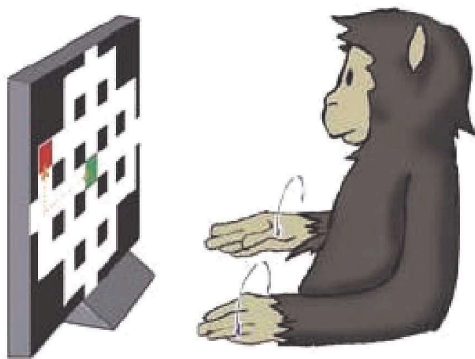


図 1. 迷路課題の概要

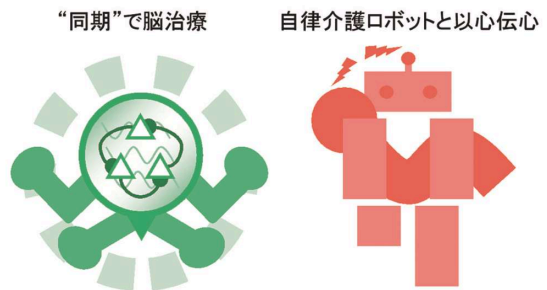


図 2. 自立工学の夢

らかとなってきました。これらを考慮しますと、抑制性細胞の一時的な選択性の低下は、行動計画や問題解決法の策定の際の様々な要因間に整合性をとる過程を反映しているのではと私個人は想像しています。

それ以外にも、神経細胞活動の多点同時記録していますので、神経細胞間の同期発火の解析も行っております。自然界の複雑な系では、要素の振る舞いが自然に同期するという秩序が創発する現象（以下、同期現象）がしばしば見られます。私どもは、行動計画のような創造的な行動の背後には、前頭前野における同期現象が存在するのではないかという仮説を検討しました。その結果、行動計画期間にみられる発火頻度表現の最終ゴール位置→1 手目カーソル方向の遷移時に、同期発火が高まることを見出しました。この結果は、問題の解決法を“アハ！”とひらめく背後には、前頭前野の神経回路における創発的な現象があることを示唆しています。私個人は、創造性と創発現象を世界で初めて結び付けたのではないかと考えています。これにつきましては、昨年 8 月 27 日の NHK 仙台放送居局および同 28 日付け河北新報朝刊で取り上げていただきました。詳しくは、Cerebral Cortex 誌 vol.18 pp. 2036-2045 (2008) を参考にいただければと思います。

最近では、スパイク間隔の揺らぎの時間変化の解析など、神経活動を多元的に解析するよう努めております。また、サルの慢性実験に適した深部まで刺せる半導体電極の開発も、虫明先生をリーダーに、本学工学部の小柳光正教授、田中徹教授、片山統裕准教授らと共に進めております。これらを総合し、大脳皮質の神経回路としての動態を、より詳細に解析できる体制作りにも励んでおります。

このような研究が、福祉工学を一步越えた自立工学とでもいう領域へ結実することを願っています（図 2）。つまり、① 脳高次機能障害の治療・回復技術の開発、具体的には、疾患領域にふさわしいトレーニング課題の開発や同期現象等を用いた神経回路の自己組織的再構築法の開発。また、② 研究成果を人工神経回路としてモデル化し、ロボットに搭載することにより、実社会“使える”自律的介護ロボット。更には、そのようなロボットと、“アイコンタクト”とでも言うべき少ない信号でコミュニケーションするまったく新しいブレイン・マシン・インターフェースの開発。これらを通じて、すべての人が自立的に生きていくうえでのトータルソリューションを提供できる医工学分野を拓いていただければいいなと夢想する昨今です。皆様にご理解をいただけましたら幸いです。



— 第7回日本 Neurogastroenterology 学会奨励賞 —

## 過敏性腸症候群における腸内細菌叢および

## 腸内有機酸と症状の関連

多那 千絵<sup>1)</sup>, 梅崎 良則<sup>2)</sup>, 今岡 明美<sup>2)</sup>半田 知美<sup>1)</sup>, 金澤 素<sup>1)</sup>, 福土 審<sup>1)</sup><sup>1)</sup>東北大学大学院医学系研究科 行動医学分野, <sup>2)</sup>ヤクルト中央研究所

過敏性腸症候群 (Irritable Bowel Syndrome; IBS) は、下痢や便秘といった便通異常を伴う、腹痛や腹部不快感といった症状を特徴としている機能性消化管障害である。IBS の病態特徴として、腸運動亢進、内臓知覚過敏および陰性情動により示される脳腸相関の制御不能が明らかになっているが、これらの

原因となる要因についてはいまだ明らかになっていない<sup>1-3)</sup>。心理的ストレスや遺伝的要因が、感染後や手術後に、低レベルな粘膜炎症、腸内細菌叢の変化などを介して IBS を引き起こすと、先行研究では報告されている<sup>4)</sup>。

ヒトの腸内細菌叢は複雑な生態系を構成している<sup>5)</sup>。消化管の感染症や抗生物質の経口摂取は腸内細菌叢を破壊し、それは機能性消化管障害の発症の引き金となる<sup>6,7)</sup>。抗生物質を投与した動物モデルでの先行研究では、腸内細菌叢が変化して内臓知覚過敏が認められ、さらにその過敏性は、乳酸菌の投与により改善したと報告している<sup>8)</sup>。また O'Mahony らは、IBS 患者の消化器症状が乳酸菌の投与で改善したことを報告している<sup>9)</sup>。IBS の動物モデルにおいて、乳酸菌の投与は直腸進展刺激の痛み閾値を 20% 増加させている<sup>10)</sup>。これらのことから腸内細菌は IBS 症状において、重要な役割を果たしていることが示唆される。

最近の研究で、IBS 患者における腸内細菌叢が変化していることが注目されている<sup>11-16)</sup>。しかし、ヒトの腸内細菌叢を構成する主な細菌属を考慮すると<sup>17)</sup>、先行研究では細菌属が部分的にしか調査されておらず、また結果が一致していない。さらに、細菌と IBS 症状との関連が明らかになっていないなど、重要な側面が不十分である。また、IBS 患者の腸内発酵が変化していることを示す研究がいくつかある<sup>18-21)</sup>。IBS 患者の

腸内において、ガスの編成が増加していることを示す先行研究もある<sup>18,19)</sup>。更に、ヒトの大腸で細菌代謝の主な生産物である短鎖脂肪酸が、下痢型 IBS で増加し、便秘型 IBS で減少しているという報告がある<sup>20)</sup>。一方で、下痢型 IBS で短鎖脂肪酸が減少しているという反対の報告もされている<sup>21)</sup>。IBS の病態に対する腸内細菌の役どころについては、いまだ十分なデータが得られていない。したがって、IBS 患者における、より広い範囲での腸内細菌叢と腸内有機酸、そして同時に起こる腹部症状の分析が必要である。本研究では、以下の仮説を検証した。(1) IBS 患者は腸内細菌叢が健常者と異なる。(2) IBS 患者は腸内有機酸のプロフィールも健常者と異なる。(3) IBS 症状は有機酸のプロフィールと関連している。

検証の結果、IBS 患者は腸内細菌叢のみならず、腸内有機酸プロフィールも健常者と異なることが示された<sup>22)</sup>。また、この腸内有機酸プロフィールの変化は、腹部症状との関連が認められた。IBS 患者は化学的刺激についても過敏性を示すことが示唆された。これまで内臓過敏性において、一般的に機械的刺激について研究されてきており、化学的刺激についてはまだ研究データが少なく、ほとんど分かっていない。腸内の酸による刺激を受容するレセプターとして、カプサイシンレセプター Trpv1 (transient receptor potential cation channel subfamily V member 1) という受容体があり、腸をはじめとする消化管に多く存在している。Trpv1 受容体は、腸内で酸を受容し脳に痛みとして刺激を伝えており<sup>23)</sup>、先行研究において、酢酸を注入し過敏性を起こしたラットで脊髄後根神経節に Trpv1 発現量が増加し、さらに Trpv1 アンタゴニストを投与したところ内臓過敏性を緩和したという報告がある<sup>24)</sup>。ヒトにおいても、直腸過敏性の患者では感覚神経線維に Trpv1 発現が増加していると報告されている<sup>25)</sup>。本研究において IBS 症状と有機酸の間に関連が見られたことは、IBS の悪化因子の1つとして、有機

酸という化学的刺激の増加が考えられ、これらは Trpv 1 受容体を介して症状に影響している可能性があることを示している。このメカニズムをさらに明らかにするために、今後はさらなる脳-腸-細菌の相互作用を分析する研究が期待される。

## 文 献

- 1) Fukudo, S., Nomura, T., Muranaka, M., et al. (1993) Brain-gut response to stress and cholinergic stimulation in irritable bowel syndrome. A preliminary study. *J. Clin. Gastroenterol.*, **17**, 133-141.
- 2) Drossman, D.A., Camilleri, M., Mayer, E.A., et al. (2002) AGA technical review on irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, **123**, 2108-2131.
- 3) Mayer, E.A. and Collins, S.M. (2002) Evolving pathophysiological models on functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterology*, **122**, 2032-2048.
- 4) Barbara, G., Giorgio, R. De, Stanghellini, V., et al. (2002) A role for inflammation in irritable bowel syndrome? *Gut*, **51**(suppl 1), i41-44.
- 5) Sonnenburg, J.L., Angenent, L.T. and Gordon, J.I. (2004) Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in our intestine? *Nature Immunology*, **5**, 569-573.
- 6) Longstreth, G.F., Thompson, W.G., Chey, W.D., et al. (2006) Functional bowel disorders. *Gastroenterology*, **130**, 1480-1491.
- 7) Spiller, R.C. (2003) Postinfectious irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, **124**, 1662-1671.
- 8) Verdú, E.F., Bercik, P., Verma-Gandhu, M., et al. (2006) Specific probiotic therapy attenuates antibiotic induced visceral hypersensitivity in mice. *Gut*, **55**, 182-190.
- 9) O'Mahony, L., McCarthy, J., Kelly, P., et al. (2005) Lactobacillus and bifidobacterium in irritable bowel syndrome: symptom responses and relational to cytokine profiles. *Gastroenterology*, **128**, 541-551.
- 10) Rousseaux, C., Thuru, X., Gelot, A., et al. (2007) Lactobacillus acidophilus modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors. *Nat. Med.*, **13**, 35-37.
- 11) Balsali, A., Ceccarelli, A., Dubini, F., et al. (1982) The fecal microbial population in the irritable bowel syndrome. *Microbiologica*, **5**, 185-194.
- 12) Si, J.M., Yu, Y.C., Fan, Y.J., et al. (2004) Intestinal microecology and quality of life in irritable bowel syndrome patients. *World J. Gastroenterol.*, **10**, 1802-1805.
- 13) Mättö, J., Maunukela, L., Kajander, K., et al. (2005) Composition and temporal stability of gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome—a longitudinal study in IBS and control subjects. *FEMS Immuno. Med. Microbiol.*, **43**, 213-222.
- 14) Malinen, E., Rinttilä, T., Kajander, K., et al. (2005) Analysis of the microbiota of irritable bowel syndrome patients and healthy controls with real-time PCR. *Am. J. Gastroenterol.*, **100**, 373-382.
- 15) Maukonen, J., Satokari, R., Mättö, J., et al. (2006) Prevalence and temporal stability of selected clostridial groups in irritable bowel syndrome in relation to predominant faecal bacteria. *J. Med. Microbiol.*, **55**, 625-633.
- 16) Kassinen, A., Krogius-Kurikka, L., Mökivuokko, H., et al. (2007) The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of health subjects. *Gastroenterology*, **133**, 24-33.
- 17) Franks, A.H., Harmsen, H.J., Raangs, G.C., et al. (1998) Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S r RNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 3336-3345.
- 18) King, T.S., Elia, M. and Hunter, J.O. (1998) Abnormal colonic fermentation in irritable bowel syndrome. *Lancet*, **352**, 1187-1189.
- 19) Koide, A., Yamaguchi, T., Odaka, T., et al. (2000) Quantitative analysis of bowel gas using plain abdominal radiograph in patients with irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.*, **95**, 1735-1741.
- 20) Mortensen, P.B., Andersen, J.R., Arffmann, S., et al. (1987) Short-chain fatty acids and the irritable bowel syndrome: the effect of wheat bran. *Scand. J. Gastroenterol.*, **22**, 185-192.
- 21) Treem, W.R., Ahsan, N., Kastoff, G., et al. (1996) Fecal short-chain fatty acids in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: in vitro studies of carbohydrate fermentation. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **23**, 280-286.
- 22) Tana, C., Umesaki, Y., Fukudo, S., et al. (2008) Altered Profiles of Intestinal Microbiota and Organic Acid May Be Origin of Symptoms in Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology*, **134**, A-158.
- 23) Tominaga, M. and Julius, D. (2000) Capsaicin Receptor in the Pain Pathway. *Jpn. J. Phar-*

- macol.*, **83**, 20-24.
- 24) Winston, J., Shenoy, M., Medley, D., et al. (2007) The Vanilloid Receptor Initiates and Maintains Colonic Hypersensitivity Induced by Neonatal Colon Irritation in Rats. *Gastroenterology*, **132**, 615-627.
- 25) Chan, C.L.H., Facer, P., Davis, J.B., et al. (2003) Sensory fibres expressing capsaicin receptor TRPV1 in patients with rectal hypersensitivity and fecal urgency. *Lancet*, **361**, 385-391.

—— 日本肝臓学会第 10 回味の素 Award ——

## 非代償性肝硬変で出現する血漿アミノ酸不均衡は 樹状細胞の成熟化を抑制する

嘉数 英二, 上野 義之, 近藤 泰輝, 福島 耕治, 椎名 正明  
井上 淳, 玉井 恵一, 二宮 匡史, 下瀬川 徹

東北大学 消化器内科



**Abstract:** An imbalance of plasma amino acids is observed in advanced cirrhotic patients. Recently, extracellular branched-chain amino acids (BCAAs), especially valine, are reported to regulate the maturation and function of monocyte-derived dendritic cells (MoDCs). In this

study, we analyzed the function of myeloid dendritic cells using a serum free culture medium consistent with the average concentration of plasma amino acids from healthy controls or advanced cirrhotic patients to reflect more closely the actual environment of the living body. After adding the stimulants, the CD83 and CD86 expressions of DCs from cirrhotic patients (LC) were lower than those from healthy controls (HC). In both HC and LC, both CD83 and CD86 expressions of DCs stimulated under the cirrhotic medium were lower than under the control medium. Similarly, the IL-12 production in the cirrhotic medium was lower than in control medium, and the production was partially recovered by adding valine or leucine to the medium. PBMCs stimulated in the autologous plasma after oral administration of BCAA granules had significantly increased interferon gamma production. Elevating the extracellular concentration of BCAAs seems to be beneficial for improving the functions of dendritic cells in advanced cirrhotic patients.

Key words: dendritic cells, BCAA, cirrhosis

### 背景・目的

近年アミノ酸はただ単に細胞骨格や様々な代謝経路の基質となるだけでなく、インスリンと共に栄養感受性シグナル経路に作用し、細胞機能を調節する事が解明されてきている<sup>1)</sup>。最近我々は、① 感染症・癌に対する免疫応答において中心的な役割を果たす樹状細胞 (DC) が細胞外の分岐鎖アミノ酸 (BCAA), 特に Valine によりその成熟化が調節される事、② 肝硬変患者では健常人と比較し DC 機能が抑制されており、細胞外の Valine 濃度を高める事により一部回復できる事を報告した<sup>2)</sup>。しかし、この検討で独自に作成した無血清培地は、各種アミノ酸濃度が生体の血漿中アミノ酸濃度よりも高濃度であり、実際の生理的環境と大きな解離があった。更に、非代償性肝硬変では BCAA だけでなく様々なアミノ酸の変動が起こり、そのインバランスが DC をはじめとした免疫細胞に与える影響は依然として不明である。通常、末梢組織に存在する DC は侵入抗原から刺激を受けた後、所属リンパ節に移動して外来抗原をリンパ球に提示する。しかし最近の報告では、末梢組織から再度血中に戻り他の遠隔組織に移行する circulating DC の存在が示唆されている<sup>3)</sup>。そこで本研究では、健常人と非代償性肝硬変患者の実際の末梢血アミノ酸濃度と一致した無血清培地をそれぞれ作製し、非代償性肝硬変患者におけるアミノ酸インバランスが circulating DC に与える影響を解析することを目的とした。

### 方 法

本研究では、健常人 ( $n=25$ ) および、非代償性肝硬変患者 (Child pugh grade B or C:  $n=43$ ) の血漿アミノ酸値の平均値を求め、それらのアミノ酸濃度と合致した無血清培地を作製し、HCM (healthy control medium), ACM (advanced cirrhotic medium) と定

義した。HCM と ACM はアミノ酸以外の組成は全て一致している（表 1）。基礎検討において、作製した培地のアミノ酸濃度を HPLC で測定し理論値と差がな

表 1. 当研究で使用した無血清培地のアミノ酸組成 (nmol/mL)

	CCM	HCM	ACM
Glycine	400	225	280
L-Alanine	400	391	307
L-Serine	400	119	151
L-Threonine	800	142	138
L-Cystine 2HCl	200	38	67
L-Methionine	200	29	75
L-Glutamine	4,000	564	689
L-Asparagine	400	51	64
L-Glutamic Acid	400	42	53
L-Aspartic Acid	400	3	4
L-Valine	800	249	175
L-Leucine	800	132	100
L-Isoleucine	800	76	53
L-Phenylalanine	400	63	99
L-Tyrosine	400	65	133
L-Tryptophan	80	62	45
L-Lysine-HCl	800	183	184
L-Arginine-HCl	400	78	92
L-Histidine HCl-H <sub>2</sub> O	200	83	85
L-Proline	400	204	176
Fischer's ratio	3.00	3.57	1.42

\* CCM: コントロールの培地

いことを確認し、48 時間の PBMC の培養後に、培地のアミノ酸濃度に大きな変動がないことを確認した。さらに、annexin V-FITC/Propidium Iodide 染色で 48 時間後の PBMC の viability を評価し、HCM, ACM が市販の X-VIVO10<sup>®</sup> と同程度の viability があることを確認した。これらの基礎検討を基に HCM, ACM 下で、myeloid DC (BDCA1+DCs) 又は 単球由来樹状細胞 (MoDCs) を LPS, poly I: C で 48 時間刺激し樹状細胞の成熟化・機能を評価した。樹状細胞機能の解析法としては、① 表現型 (フローサイトメトリー CD14 CD40 CD83 CD86 CD98 HLA-DR), ② サイトカイン産生能 (ELISA IL-10, IL-12), ③ 貪食能 (FITC-dextran uptake), ④ CD4+リンパ球刺激能 (CFSE assay 又は MTS assay), ⑤ 細胞内シグナル (ウェスタブロットング) を行った (図 1)。

## 結 果

まず、健常人において解析を行った。リンパ球全体の反応として PBMC を HCM と ACM 下で刺激しサイトカインの産生を比較したところ、HCM と比較して LPS, poly I: C いずれの刺激においても ACM 下では IFN gamma の産生が低下した。更に刺激後の BDCA1+DCs の表現型を比較したところ ACM では成熟化マーカーである CD83, CD86 の発現が有意に低下した。培養上清中のサイトカイン測定では ACM 下では有意に IL-12 の産生が低下した。CD4+リンパ球刺激能も ACM 下では低下を認め、貪食能に関しては

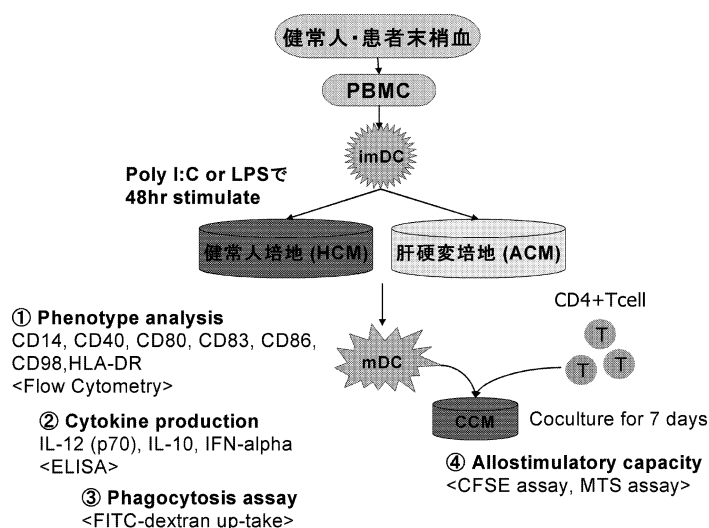


図 1. 当研究の実験方法

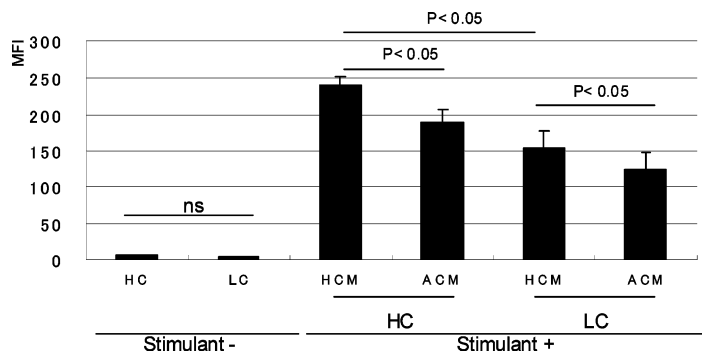


図2. 健康人, 非代償性肝硬変患者の刺激前後の樹状細胞成熟化マーカー (CD83) の発現レベル (flow cytometry)

HC: 健康人から採取した DCs

LC: 非代償性肝硬変患者から採取した DCs

両培地間で差を認めなかった。これらの現象に合わせて、BDCA1+DCsの細胞内のシグナルを解析したところ ACM 下では mTOR signal の下流である S6K のリン酸化が抑制されていた。

表現型に関して非代償性肝硬変患者の BDCA1+DCs においても解析を行った。刺激前の表現型は健康人と差を認めないものの、刺激後では非代償性肝硬変患者の成熟化マーカー (CD83, CD86) の発現は HCM, ACM いずれにおいても健康人よりも有意に低下していた。興味深いことに非代償性肝硬変患者の BDCA1+DCs においても HCM と比較して ACM 下では CD83, CD86 の発現が有意に低下した (図2)。

## 考 察

今回、新たに2種類の培地 (HCM, ACM) を作成する事でより生体のアミノ酸環境に近い状態で樹状細胞の機能解析を行うことが可能となった。今回の結果から非代償性肝硬変患者では刺激に対する樹状細胞自体の成熟化が抑制されているだけでなく血漿中のアミノ酸不均衡も成熟化を抑制することが明らかとなった。また、そのアミノ酸不均衡を補正することで部分的に

成熟能を改善できる可能性が示唆された。更にこれらの現象は mTOR シグナルが関与していることが明らかとなった。

## 結 論

非代償性肝硬変で出現する血漿アミノ酸不均衡は樹状細胞の成熟化を抑制し、それを健康人のレベルに補正することで改善する可能性が示唆された。

## 文 献

- 1) Cohen, A. and Hall, M.N. (2009) An amino acid shuffle activates mTORC1. *Cell*, **136**, 399-400.
- 2) Kakazu, E., Kanno, N., Ueno, Y., et al. (2007) Extracellular branched-chain amino acids, especially valine, regulate maturation and function of monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.*, **179**, 7137-7146.
- 3) Bonasio, R. and von Andrian, U.H. (2006) Generation, migration and function of circulating dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.*, **18**, 503-511.

— PACTRIM 2008 Best Presentation Award —

## 視神経脊髄炎とアストロサイトパチー

—— 髄液中 GFAP の有用性 ——

三 須 建 郎

東北大学大学院医学系研究科 神経内科・多発性硬化症治療学



### はじめに

視神経脊髄炎 (Neuro-myelitis optica: NMO, 別名 Devic 病) は、視神経と脊髄を病変の首座とする炎症性疾患であり、多発性硬化症 (Multiple Sclerosis: MS) の一亜型と考えられてきたが、MS の長い研究史の中でも最もその異同が議論されてきた疾患といえる。特に、日本では NMO を視神経脊髄型 MS と呼称し、MS の一部と考えてきた歴史的背景がある<sup>1)</sup>。

2004 年、Mayo clinic と当科の共同研究によって、NMO の血清中に中枢神経系の軟膜や血管周囲に特異的に反応する抗体が見いだされ、2005 年にその対応抗原がアストロサイトの足突起に高密度に発現するアクアポリン 4 (AQP4) であることが判明した<sup>2,3)</sup>。我々は AQP4 の病理学的検討を行い、NMO の急性期脊髄病変では AQP4 は欠落しており、同部位でアストロサイトのマーカーであるグリア線維酸性蛋白 (GFAP) の発現も低下すること、また AQP4・GFAP の欠落とは対比的に髄鞘は比較的保存されることを報告し、NMO は髄鞘が一次性に障害される MS とは異なり、アストロサイトが一次性に障害される疾患であることが判明した<sup>4,5)</sup>。

これまで、アストロサイト障害が疾患の本質であると明確に言える神経疾患は知られていなかった。我々は、臨床的に NMO や神経疾患においてアストロサイト障害を評価する事が病態を理解する上で有用であると考え、NMO 患者の髄液中 GFAP・S100B 濃度を測定し、その臨床的意義を検討した。本稿では、2008 年 11 月に行われた第 1 回 Pan-Asian Congress of Treatment and Research in Multiple Sclerosis (PACTRIMS) に於いて発表した内容を中心に紹介する。

### NMO におけるアストロサイト障害 ～多発性硬化症・脱髄との相違

神経系はニューロンとグリアで構成されており、グリアにはアストログリア、髄鞘を形成するオリゴデンドログリア、ミクログリアが知られている。MS は、時間的空間的に多発する炎症性脱髄を特徴とし、オリゴデンドログリア (髄鞘) の減少と、19 世紀に Charcot が名付けた疾患名の由来でもある“硬化 (グリオーシス)”を担うアストロサイトによって病変が覆われる事を 1 つの特徴とする。一方、1894 年の Devic による剖検例の報告以来、NMO の病巣は灰白質を含む広範な組織の軟化壊死が目立ち、浮腫性変化、空洞形成や血管増生などの壊死性変化を特徴とするなど、MS とは異なる特徴を有することが以前から知られていたが、その両者には明確に区別は無かった。

我々は NMO の急性脊髄病変における AQP4 の発現について免疫組織学的検討を行い、世界に先駆けて AQP4 が病変部で脱落する事実を報告した<sup>4)</sup>。NMO 脊髄病変においては、中心灰白質は広範に AQP4 が脱落しており、脊髄周辺の白質においても、補体である C9neo の沈着する血管周囲で AQP4 は欠落し、また同部位では GFAP の染色も低下あるいは消失していた。さらに興味深いことには急性期 NMO 病巣では、髄鞘蛋白であるミエリン塩基性蛋白 (MBP) の免疫染色性は比較的保たれていた。一方、MBP が境界明瞭に脱落する MS の脱髄病変においては、AQP4 や GFAP の脱落は認められず、むしろグリオーシスに伴って発現は亢進していた。これらの特徴から、AQP4 抗体は補体介在性にアストロサイトを障害することが示唆され、脱髄疾患である MS とは根本的に病態が異なる疾患である事が判明した<sup>5)</sup>。

### NMO における髄液中 GFAP 濃度の著明上昇

我々は、NMO における有用な臨床的細胞障害マ-



カーを検索する事を目的に、髄液中の各種細胞障害マーカーを検討した<sup>6)</sup>。今回、急性期の AQP4 抗体陽性 NMO 患者 10 名, MS 患者 10 名, 急性散在性脳脊髄炎患者 (ADEM) 3 名, 脊髄梗塞患者 3 名, および正常対照者 5 名の髄液を用い, アストロサイトのマーカーである GFAP および S100B を, ELISA 法を用いて検討した。その結果, 急性期の NMO 患者の髄液中 GFAP 濃度 ( $7,666.0 \pm 15,266.5$  ng/ml) は, MS 患者 ( $0.7 \pm 1.5$ ) や正常対称 ( $0.6 \pm 0.3$ ) と比べて極めて有意に高く, ADEM ( $0.4 \pm 0.2$ ), 脊髄梗塞 ( $354.7 \pm 459.0$ ) と比べても, はるかに高値であった (図 1)。S100B も同様に, NMO にて高い傾向が認められた。NMO と MS では血液中や髄液中の多くの因子が検討されてきたが, これ程まで両者でレベルの違う結果は他に類を見ない。本来, 髄液中 GFAP はグリオーシスの指標として用いられてきたが, グリオーシスをその病理学的特徴とする MS では既報と同様に上昇は軽微であり, 比較的激しい脱髄を来す ADEM でも相応の上昇が認められなかった。これらの NMO における髄液中 GFAP の上昇は, 報告されている他の組織破壊性の疾患 (脳梗塞, ヘルペス脳炎, 頭部外傷など) における濃度をも凌駕するレベルであった (表 1)<sup>7-10)</sup>。これまでの髄液中 GFAP 濃度の検討は, 組織破壊に伴う非特異的な上昇として捉えられてきた<sup>7-10)</sup>。しかし, AQP4 抗体によってアストロサイトに対する自己免疫現象が生じるとされる NMO において髄液中 GFAP が特

異な著しい上昇を認めることから, 今後髄液中 GFAP 濃度はアストロサイト障害マーカーとして捉えられるべきと考えている。

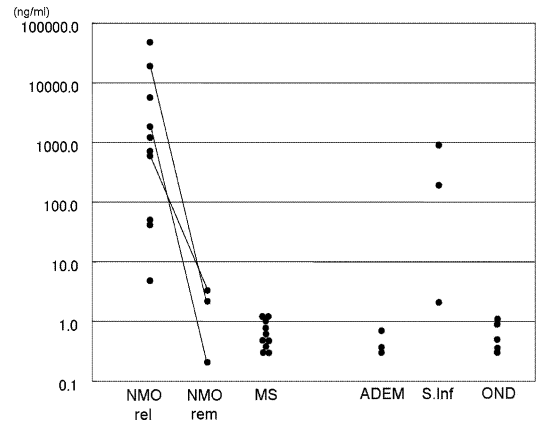


図 1. 視神経脊髄炎 (NMO), 多発性硬化症 (MS), 急性散在性脳脊髄炎 (ADEM), 脊髄梗塞 (S.Inf), 正常対称群 (OND) における髄液中 GFAP 濃度の検討

NMO の急性期 (rel) においては, MS や対称と比較して極めて髄液中 GFAP 濃度が高かったが, 治療前後で計測した 3 例においては, 治療により速やかに正常レベルに近いレベルに復した (rem) (治療前  $17,826.6 \pm 26,142.2$  pg/ml → 治療後  $1.8 \pm 1.5$ ). NMO の著名な上昇とは対照的に, 急性期 MS や ADEM で顕著な GFAP 濃度の上昇は認められず, アストロサイトパチーではないことが示唆された。

表 1. 各種神経疾患における髄液 GFAP 濃度の比較

Disease category	n	Values (pg/ml)	Control values (pg/ml)	Sensitivity (pg/ml)	Reference No.
Non-destructive					
Multiple sclerosis					
Study 1.	13	$386 \pm 169^a$	$142 \pm 26^a$	32	7
Study 2.	51	3 (0-16) <sup>b</sup>	1 (0-13) <sup>b</sup>	n.a.	8
Alzheimer's disease	7	500-1,500 <sup>c</sup>	200-500 <sup>c</sup>	32	9
Destructive					
Cerebral infarction	6	$78,216 \pm 62,859^a$	200-500 <sup>c</sup>	32	9
HSV encephalitis	4	$28,250 \pm 20,240^a$	200-500 <sup>c</sup>	32	9
SAH	5	$18,950 \pm 16,078^a$	<9	5	10
Brain injury	11	$16,678 \pm 15,022^a$	<9	5	10
Present study					
Neuromyelitis optica	10	$7,666,000 \pm 15,266,500$	$600 \pm 300$	40	
Multiple sclerosis	10	$700 \pm 1,500$	$600 \pm 300$	40	

All units have been converted to pg/ml for comparison. <sup>a</sup>Mean  $\pm$  S.D. or <sup>b</sup>median values with ranges were given. <sup>c</sup>Approximate ranges from the original data. GFAP=glial fibrillary acidic protein; n.a.=not available; HSV=herpes simplex virus; SAH=subarachnoid hemorrhage

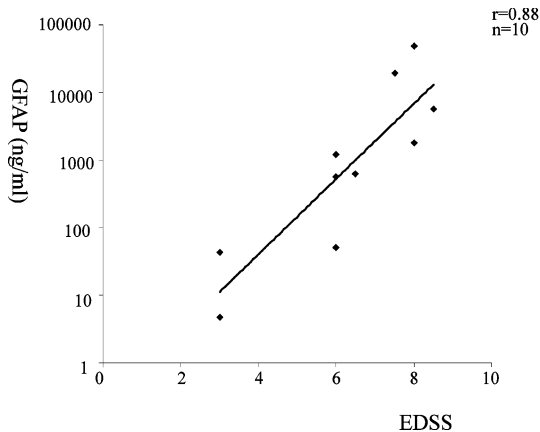


図2. NMOにおける髄液中GFAP濃度と重症度スコア(EDSS)の相関

NMOにおいて、髄液中GFAP濃度は疾患重症度スコアであるEDSSと強い正の相関を示し(図2)、また脊髄炎の病変の長さとも正の強い相関が認められた( $r>0.8$ )が、MSでは相関は認められなかった。また、ステロイドパルス療法後、早期から髄液中GFAP濃度は正常化しており、病勢に応じた動態を示していた。髄液中GFAP濃度は、症状の程度・予後を反映して上昇する事が示唆され、臨床上也に有用な検査であると思われる。

## むすび

髄液GFAPは、NMOの診療上有用なアストロサイト障害のマーカーであることが示唆されるとともに、NMOはMSとは全く異なる概念アストロサイトパチーの疾患である事が示唆された。今後、脳虚血、頭部外傷、てんかんなど、脳の壊死性傷害が予後を決する疾患においても、重要な指標となりうる検査であると考えている。

最後に、本研究によりPACTRIMSにおいてBest Present Awardを頂き、また東北医学会誌に貴重な投稿の機会を与えて頂き、研究を主動した高野里奈先生、ご指導頂いた糸山泰人教授、藤原一男教授をはじめ関

係の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Misu, T., Fujihara, K., Nakashima, I., et al. (2002) Pure optic-spinal form of multiple sclerosis in Japan. *Brain*, **125**, 2460-2468.
- 2) Lennon, V.A., Wingerchuk, D.M., Kryzer, T.J., et al. (2004) A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet*, **364**, 2106-2112.
- 3) Lennon, V.A., Kryzer, T.J., Pittock, S.J., et al. (2005) IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J. Exp. Med.*, **202**, 473-477.
- 4) Misu, T., Fujihara, K., Nakamura, M., et al. (2006) Loss of aquaporin-4 in active perivascular lesions in neuromyelitis optica: a case report. *Tohoku J. Exp. Med.*, **209**, 269-275.
- 5) Misu, T., Fujihara, K., Kakita, A., et al. (2007) Loss of aquaporin 4 in lesions of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Brain*, **130**, 1224-1234.
- 6) Misu, T., Takano, R., Fujihara, K., et al. (2009) Marked increase in cerebrospinal fluid glial fibrillary acidic protein in neuromyelitis optica: an astrocytic damage marker. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **80**, 575-577.
- 7) Rosengren, L.E., Lycke, J. and Andersen, O. (1995) Glial fibrillary acidic protein in CSF of multiple sclerosis patients: relation to neurological deficit. *J. Neurol. Sci.*, **133**, 61-65.
- 8) Petzold, A., Eikelenboom, M.J., Gveric, D., et al. (2002) Markers for different glial cell responses in multiple sclerosis: clinical and pathological correlations. *Brain*, **125**, 1462-1473.
- 9) Rosengren, L.E., Wikkelso, C. and Hagberg, L. (1994) A sensitive ELISA for glial fibrillary acidic protein: application in CSF of adults. *J. Neurosci. Methods*, **51**, 197-204.
- 10) Petzold, A., Keir, G., Green, A.J.E., et al. (2004) An ELISA for glial fibrillary acidic protein. *J. Immunol. Methods*, **287**, 169-177.

—— 日本医療・病院管理学会賞（論文） ——

## 医師の勤務状況とエラー・ニアミス要因の検討

—— 地方の中核病院の勤務医の場合 ——

金子 さゆり

東北大学大学院医学系研究科 医療管理学分野



### 緒 言

近年、医療事故に関する報道が続発しており、患者の安全確保は社会的にも大きな関心事となっている。医療安全の確保に向けて各医療機関では安全管理体制の充実、強化などの取り組みがなされているが、医療事故

が減少する兆しはみられない<sup>1,2)</sup>。事故防止には安全管理体制の充実、強化のみならず、医療従事者の労働環境の改善もまた極めて重要である。

OECD ヘルスデータ<sup>3)</sup>によると、我が国の患者あたり医師の人員配置は欧米諸国に比べて少ない状況にあり、医師一人あたりに係る負担は大きいと考えられる。さらに我が国では地方における医師不足、診療科偏在の深刻化が指摘されている<sup>4)</sup>。これは過重労働と表裏一体の課題であり、こうした状況は病院勤務医の過重労働を促すだけでなくバーンアウトや離職の引き金となりかねず、また患者サービスは低下し医療事故がより誘発される恐れも懸念される。

医師の人的資源と患者安全の関係に言及した実証研究は十分になされておらず、対策を講じることも提言されていない。以上のことを踏まえ、本研究は地域の中核病院に勤務する医師の勤務実態および心身の疲労・ストレスの状態から医療事故に関連するリスク要因を明らかにし、患者安全の確保に向けた方策について検討した。

### 方 法

宮城県内の臨床研修病院 18 施設に勤務する医師 841 名を対象に、2005 年 11 月～2006 年 4 月に自記式質問紙調査を行った。調査は対象となった各施設の承諾を得て行われ調査票は施設長を通して配布、回収は

郵送法にて行った。調査内容は勤務状況、仕事に関するストレス<sup>5)</sup>、ニアミス・エラー頻度、不可逆性疲労の程度、属性などである。分析は内科系医師、外科系医師それぞれについて、過去 6 ヶ月間でニアミスおよびエラーを有した群（以下、エラー・ニアミス有群）とニアミスおよびエラーが無の群（以下、エラー・ニアミス無群）を設定し、各要因についてロジスティック回帰分析を行った。

### 結 果

242 名（回収率 28.8%）から回答を得、そのうち内科系と外科系の常勤医師は 196 名であった。内科系医師は男性が 93.2%、平均年齢は 45.5 歳、経験年数は 19.0 年、当該施設での勤務年数は 7.5 年であり、エラー・ニアミスの有無別で有意な差はなかった。外科系医師は男性が 89.1%、平均年齢は 43.8 歳、経験年数は 18.3 年、当該施設での勤務年数は 5.4 年であり、エラー・ニアミスの有無別で有意な差はなかった。

勤務状況について、内科系医師の場合、総労働時間/週は 70.5 時間、勤務時間/日は 11.1 時間、そのうち外来診療時間は 5.1 時間、病棟診療時間は 4.2 時間、休憩時間は 0.7 時間であった。エラー・ニアミスの有無別では、エラー・ニアミス有群が無群に比べて当直回数は多く、総労働時間/週は長く、外来患者数/日と入院患者数/日は多かった。外科系医師の場合、総労働時間/週は 68.7 時間、勤務時間/日は 10.8 時間、そのうち外来診療時間は 4.7 時間、病棟診療時間は 3.2 時間、休憩時間は 0.6 時間であった。エラー・ニアミスの有無別では当直回数、総労働時間/週、勤務時間/日、休憩時間、外来診療時間、病棟診療時間はほぼ同じであったが、外来患者数/日は多かった。また、仕事のストレスについてみると、業務量の過重負荷や業務内容の質的負担を示す仕事の負担度は、内科系で 8 割、外科系で 9 割の人が高いと答え、仕事の満足度は内科系で 7～8 割、外科系で 6～8 割の人が高いと答え、これらはエラー・

ニアミスの有無別で有意な差はなかった。不可逆性疲労については内科系で7～9割、外科系で5～9割の人が訴えていた。

ロジスティック回帰分析の結果、内科系医師の場合、当直回数/月 (OR: 1.31, 95%CI: 1.01-1.71), 心理的ストレス (4.79, 1.02-24.27) がエラー・ニアミスの関連要因として示された。外科系医師の場合、職場の支援 (8.75, 1.01-76.10), 心理的ストレス (10.33, 1.21-88.36), 勤務中の体力的限界 (7.00, 1.99-24.58), 休日後の疲労蓄積 (6.82, 1.36-34.27) が関連要因として示された。

## 考 察

厚生労働省の研究班が行った全国の病院勤務医を対象にした調査<sup>6)</sup>に比べて、本調査対象の勤務時間は1.1倍、休憩時間は0.8倍、外来患者数/日は1.7倍、外来診療時間/日は1.8倍、入院診療時間/日は0.8倍であった。調査対象の勤務医は外来患者数が多いため入院診療よりも外来診療に多くの時間がとられており、外来診療にかかる負担が大きいことが示唆された。このことから地域の中核病院は現行の外来機能を縮小するか、医師を増員するかしない限り、入院診療にかかる時間を十分確保することは困難であると考えられる。入院患者の安全性と患者サービスの観点から、入院診療に必要十分な時間を確保することは極めて重要である。医師の勤務状況の改善を図るには、地域の中核病院は地域連携を促進させ、外来機能を専門外来に限定するなど機能分化を進め、外来負担を軽減することが方策の一つと考えられる。

内科系医師の場合、当直回数/月がエラー・ニアミスの関連要因であり、当直回数が1回増える毎にエラー・ニアミスが1.3倍に増すことが示唆された。現状は、約9割の医師が宿直明けも通常の勤務についているとの報告<sup>7,8)</sup>もあり、本調査においても当直による長時間勤務の影響、当直業務の負担もしくは当直後の業務負荷による影響がその背景にあると推察される。このことから、より安全な医療提供のためには医師1人あたりの当直回数の軽減、当直後の勤務状況の改善が不可欠と考えられる。本結果では1ヶ月あたり当直回数を平均1.6回まで減らすことによってエラー・ニアミスが軽減される可能性が示唆されたものの、これを遵守するためには1病院あたり約19人の医師が必要であり、さらに当直後の休日を確保するための増員が必要となる。しかし、病院に勤務する医師の超過勤務を是正するには約55,000人の医師が必要になるとの

推計<sup>9)</sup>が示されており、全国的に医師数の大幅な増加が見込めない現状においては、医師不足が深刻化すると想定される地域では、病院再編によって1病院あたりの医師数を増加させ、医師の勤務条件を改善することが課題解決に向けた一つの方策になると考えられる。そのためには地域の医療需給を適切に把握し、地域に必要な病床数から1病院あたりの規模および必要医師数など需給バランスの適正水準について検討する必要がある。

一方、外科系医師の場合、エラー・ニアミスの関連要因として職場の支援と不可逆性疲労が示されたが、これらは内科系医師では関連がみられなかった。このことは内科系と外科系の業務特性の相違に起因するものと推察される。外科系医師の場合は複数の医師が1患者を診る体制で診療を行っており、特定の医師に負担がかかっている可能性が否定できず、このことがエラー・ニアミス発生に関連していると考えられる。

さらに、内科系と外科系の医師に共通したエラー・ニアミスの関連要因として心理的ストレスによる影響が明らかになり、これが高い場合は低い場合に比べて内科系では4.8倍、外科系では10.3倍エラー・ニアミスの申告となることが示された。心理的ストレス反応を示す兆候を自覚した場合は一層の注意が必要である。また今後、医師の心理的ストレスに影響する要因について業務分析などを勘案して検討する必要がある。

## 結 論

調査対象の勤務医は、外来患者数が多いため入院診療よりも外来診療に多くの時間がとられており、外来診療にかかる負担が大きいことが示唆された。地域の中核病院は医師の疲弊を防ぐため、外来機能を専門外来に限定するなどにより、外来負担を軽減することが望まれる。また、エラー・ニアミスの影響要因として内科系医師は当直回数/月と心理的ストレスが示され、外科系医師では職場の支援、心理的ストレス、不可逆性疲労が示された。

安全な医療を提供するためには医師の勤務条件の改善が必須であり、この問題解決には地域の病院再編、集約化によって1病院あたりの医師数を確保することが望ましく、そのためには地域の医療需給バランスの適正水準について検討する必要がある。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導ご鞭撻をいただきました本学医療管理学分野の濃沼信夫教授、伊藤道哉講師に深く感謝いたします。また、本調査にご協力頂きました勤務医の先生方、調査票の配布にご助力頂きました施設長の方々に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 日本医療機能評価機構 (2006) 医療事故情報収集等事業年報. [http://www.jcqh.or.jp/html/documents/pdf/med-safe/year\\_report\\_2006.pdf](http://www.jcqh.or.jp/html/documents/pdf/med-safe/year_report_2006.pdf)
- 2) 日本医療機能評価機構 (2005) 医療事故情報収集等事業年報. [http://www.jcqh.or.jp/html/documents/pdf/med-safe/year\\_report.pdf](http://www.jcqh.or.jp/html/documents/pdf/med-safe/year_report.pdf)
- 3) OECD (2007) Health Data.
- 4) 東北大学医学部地域貢献作業班ワーキンググループ (2004) 地域医療のシステムを考える. 最終答申.
- 5) 下光輝一 (2004) 職業性ストレス簡易調査票を用いたストレスの現状把握のためのマニュアル. <http://www.tokyo-med.ac.jp/ph/ts/manual11.pdf>
- 6) 医師の需給に関する検討会 (2007) 医師需給に係る医師の勤務状況調査. <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2006/03/s0327-2c.html>
- 7) 日本医師会 (2006) 大阪府医師会の勤務医アンケート. 日医ニュース 第1045号, <http://www.med.or.jp/nichinews/n170320k.html>
- 8) 日本医療労働組合連合会 (2006) 医師の労働実態調査. [http://www.irouren.or.jp/jp/html/menu6/pdf/070424ishi\\_jittai\\_tyosa\\_shiryo.pdf](http://www.irouren.or.jp/jp/html/menu6/pdf/070424ishi_jittai_tyosa_shiryo.pdf)
- 9) 医師の需給に関する検討会 (2007) 医師の需給に関する検討会報告書. <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2006/07/dl/s0728-9c.pdf>

—— 第 67 回日本公衆衛生学会総会優秀ポスター賞 ——

## 政策的な議論を有意義なものとするための医師偏在の指標と 医師数マップ作成の試み

金 村 政 輝

東北大学病院 総合診療部



### 1. 背 景

医師不足は地域医療の深刻な問題となっている。医師数と医師の労働時間の国際比較などからは医師数の絶対数の不足が指摘されている<sup>1)</sup>。一方、医師の偏在があることも指摘されている。

厚生労働白書<sup>2)</sup>によれば、2004 年の都道府県別での診療従事医師数(人口 10 万人対、以下同じ)を比較すると、最大は東京都の 264.2 人、最小は埼玉県の 129.4 人で 2.0 倍の差があった。二次医療圏別での診療従事医師数を同一の都道府県内で比較すると、東京都では最も少ない二次医療圏での診療従事医師数が 123.5 人であるのに対して、最も多い二次医療圏では 1,190.6 人で 9.6 倍の差があった。また、富山県では最も少ない二次医療圏では 167.5 人であるのに対して、最も多い二次医療圏では 257.7 人とその差は 1.5 倍であった。

しかし、これまで、医師偏在の詳細については十分に示されていない<sup>3)</sup>。医師偏在を簡便な指標で示し、経時的な変化を示すことができれば、政策的な議論をより有意義なものにすることが期待される。そこで、本研究では、簡便な指標を用い、その経時的な変化についてグラフ及び地図により図示することを試みた。

### 2. 対象と方法

2 年に 1 度定期的実施され、集計結果が公表されている医師調査のデータを用いた。厚生労働省統計表データベースシステム([http://www.dbtk.mhlw.go.jp/IPPAN/ippan/scm\\_k\\_Ichiran](http://www.dbtk.mhlw.go.jp/IPPAN/ippan/scm_k_Ichiran))から 2002 年及び 2004 年の都道府県別診療従事医師数のデータ(41 表及び 42 表)をダウンロードした。

#### (1) 診療科別医師数についてのグラフ化

都道府県別医師数の最大値を最小値で除した値を「格差」と定義し、2002 年と 2004 年のそれぞれについて診療科別に格差を算出し、グラフで図示した。さらに、同一都道府県内の診療科別医師数について 2002 年から 2004 年までの 2 年間における増減率を算出し、グラフで図示した。

#### (2) 医師数マップの作成

2004 年の都道府県医師数と 2002 年から 2004 年までの 2 年間における増減率を用い、日本地図に色分けして表示し、「医師数マップ」を作成した。

データの集計とグラフ作成には Microsoft 社の Excel 2003 を、また、地図作成にはフリーウェアの地理情報分析支援システム MANDARA(ver8.04)(<http://ktgis.net/mandara/>)を用いた。

### 3. 結 果

#### (1) 診療科別医師数についてのグラフ化

2004 年の診療科別医師数について、多い順から棒グラフで表示し、2002 年と 2004 年の格差を折れ線グラフで表示した(図 1)。医師数の多い診療科ほど格差が小さく、約 2~3 倍であった。しかし、医師数の多い診療科でも 2 年間で格差が増大している診療科があり、内科で 2.6 倍から 8.4 倍へ、産婦人科で 2.1 倍から 6.9 倍へと増大していた。格差の最大は 2002 年で小児外科の 17.0 倍、2004 年で神経内科の 25.0 倍であった。

同一県内(宮城県)での診療科別医師数については、医師数の多い診療科ほど増減は少なかった。しかし、医師数の多い診療科でも内科、小児科は減少傾向にあった。

#### (2) 医師数マップの作成

2004 年の医師数に基づき医師数マップを作成した。

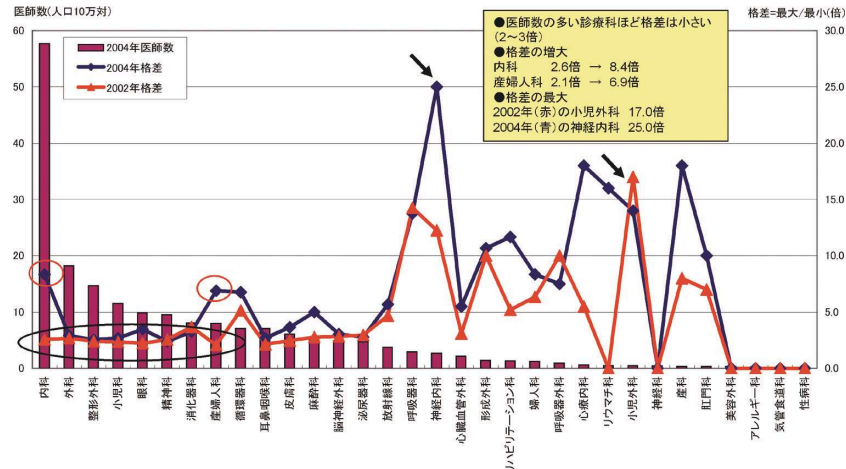


図1. 診療科別医師数(全国での比較)

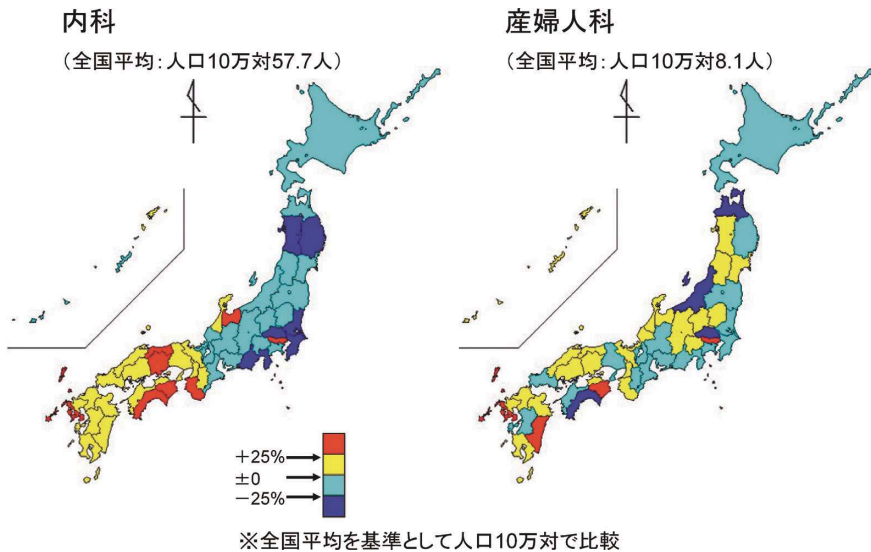


図2. 医師数マップ(2004年)

医師は西日本に多く東日本に少なく、東京近県においては全国平均の75%未満であった。診療科別に見ると(図2)、内科では、医師は西日本に多く東日本に少なかったが、東北、関東、静岡県では全国平均の75%未満と少なかった。産婦人科では、地域的な傾向を特に見出すことはできなかったが、青森県、新潟県、埼玉県、高知県で全国平均の75%未満と少なかった。

増減率で見ると(図3)、内科は全国的に減少傾向にあり、3%を超えて増加しているのは埼玉県と福岡県だけであった。産婦人科でも全国的に減少傾向にあり、3%を超えて増加しているのは宮城県、長野県、福井

県、滋賀県、島根県、宮崎県の6県だけであった。

#### 4. 考 察

公表されている統計データ、安価なソフトウェア、フリーウェアによって医師の偏在の程度とその経時的な変化について簡便に表現することが可能であった。医師の偏在についてデータを視覚的にわかりやすく提供することは政策的な議論に役立てられることが期待される。

米国では、医師需給政策に関して研究基盤が構築さ



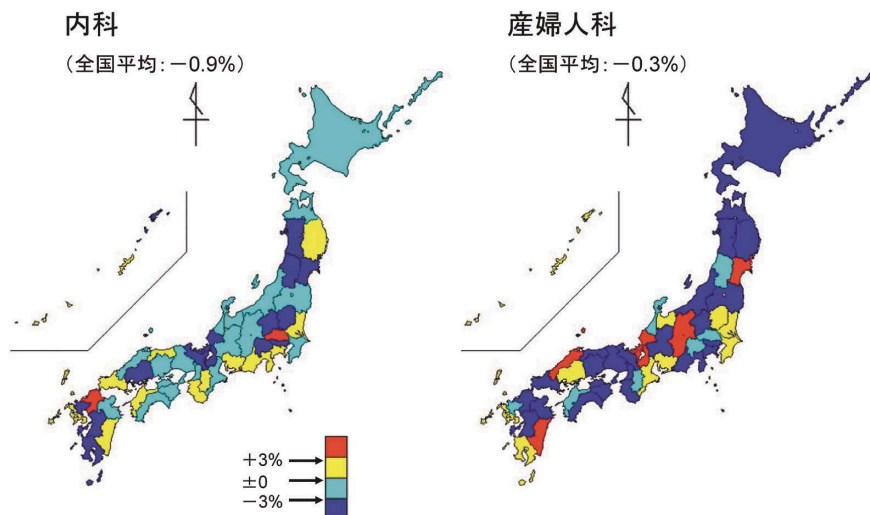


図2. 医師数マップ (2002 年～2004 年増減率)

れ、多くのスタッフ数のもとで多くの研究成果が発表されており<sup>3)</sup>、政府機関も情報提供を行っている (<http://bhpr.hrsa.gov/healthworkforce/>)。今後、公的機関、団体、持続的な研究助成などにより恒常的に情報提供する仕組みが必要と考えられた。

## 5. 謝 辞

本研究は(財) 長陵医学振興会より平成 19 年度研究助成を受けて実施いたしました。ご指導いただきました本学医学系研究科伊藤恒敏教授、本郷道夫教授に感

謝申し上げます。

## 文 献

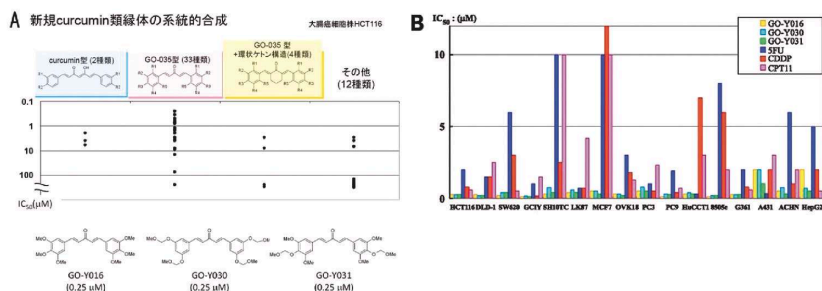
- 1) 伊藤恒敏 (2008) マグネットホスピタル, 日本医療企画, 東京, pp. 92-121.
- 2) 厚生労働省 (2007) 平成 19 年度版厚生労働白書, ぎょうせい, 東京, p. 45.
- 3) 金村政輝, ほか (2006) 医師不足はアクセスの公平性を損ねる重大な問題－政策科学の視点からの解決が必要. 日本医事新報, 4310, 81-84.

東北大学加齢医学研究所 癌化学療法分野



かつて創薬といえば民間伝承や草木などの天然化合物を元にして創られたものが多くを占めた。アスピリンは柳の樹皮から抽出されたものであるし、抗コレステロール薬のスタチンや抗菌薬のペニシリンはカビ由来である。その後、技術の進歩とと

新規類縁体の標的分子について、ウェスタン・ブロッティングで検討を行った。クルクミン、GO-Y030、Y031 は、HCT116 (大腸癌細胞腫) において、ErB-2、c-Myc、cyclinD1 などのオンコジーン産物の発現を減少させることが判明した<sup>5)</sup>(図 2A)。また、クルクミン



A: 骨格別スクリーニングと系統的合成 B: 各癌細胞種別, 抗がん剤との比較

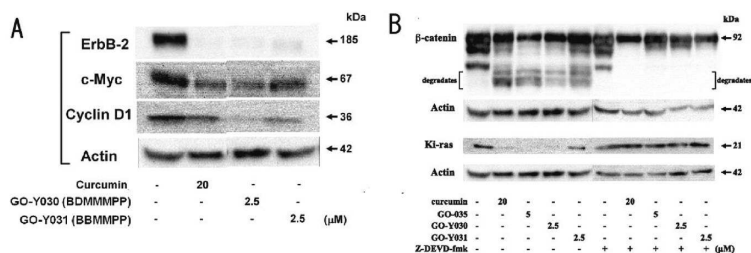


図2. 新規クルクミン類縁体における標的分子のウェスタン・ブロッティング解析

A: クルクミン, 新規類縁体処理による HCT116 (大腸癌) における Erb-2, C-Myc, Cyclin D1 の蛋白発現レベル

B: クルクミン, 新規類縁体処理による, HCT116 (大腸癌) における  $\beta$ -catenin, Ki-ras の蛋白発現レベル

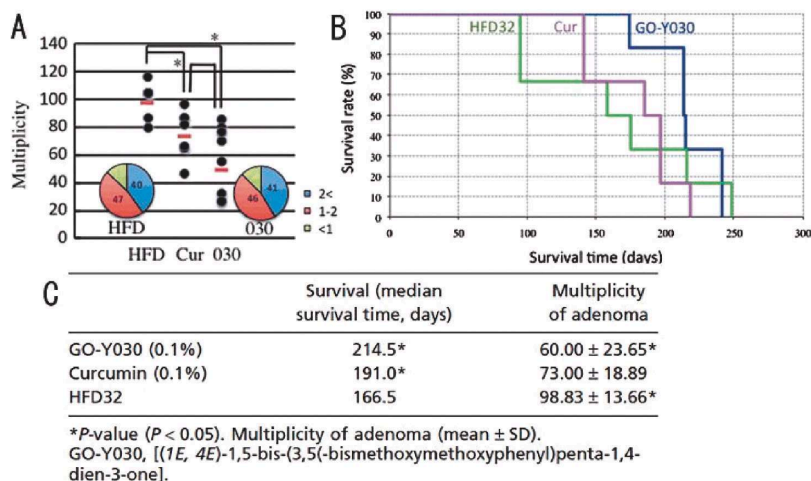


図3. クルクミン類縁体の家族性大腸腺腫症 (FAP) モデルマウスにおける検討

A: HFD, クルクミン (cur), Y030 投与を与えた APC<sup>580D/+</sup> マウスの消化管の総腫瘍数, 腫瘍の大きさ別頻度 (2 mm 以上, 1-2 mm, 1 mm 以下) を円グラフに示す.

B: APC<sup>580D/+</sup> マウスの Kaplan-Meier 生存曲線. クルクミン投与群と Y030 投与群間の P 値は 0.048 (HR=0.39, 95% confidence interval, 0.14-2.18).

C: クルクミン類縁体の化学発がん予防効果. 生存期間中央値と腫瘍数を示す.

は Ki-ras の抑制や  $\beta$ -catenin の分解を引き起こすことがよく知られているが, 類縁体の GO-035, GO-Y030, Y031 はクルクミンより低い濃度で,  $\beta$ -catenin の分解を引き起こし, Ki-ras の発現を抑制することが認められた (図 2B).

### in vivo における発がん予防効果

クルクミン及び新規類縁体による発がん予防効果を APC の germ-line mutation をもつ家族性大腸腺腫症 (FAP) モデルマウス (APC<sup>580D/+</sup> マウス) を用いて検証した<sup>6)</sup>. このマウスは腸管のポリポーシスによる腸閉塞で早期に死亡する. このマウスに対して, クルクミン 0.1%, Y030 0.1%, 0.5% を経口投与し消化管

腫瘍の発生数と生存日数を比較した. 腫瘍数はコントロール群 (Hyper Fat Diet32, HFD32) で  $98.83 \pm 13.66$  個, Y030 投与群で  $60.00 \pm 23.65$  個と腫瘍発生率が著明に減少させた (図 3A, 3C). また生存期間においてもコントロール群の生存期間 (166.5 日) と比較し, クルクミン投与群は生存期間の延長が認められ (191.0 日), Y030 投与群は更なる生存期間の延長 (214.5 日) が認められた (図 3B, 3C). クルクミン類縁体投与による, 肝機能障害や腎機能障害は認められなかった.

### おわりに

クルクミンの新規アナログ合成により, クルクミンより抗腫瘍効果が増強した化合物が得られた. また新

規化合物 (Y030) は発がん予防効果を認め、なお且つ明らかな副作用を認めなかった。

現在、抗腫瘍効果が高く、生体内有用性の高い類縁体を新たに合成しており、臨床応用を目指し、さらなる解析を行っている。

### 謝 辞

本研究は、東北大学大学院加齢医学研究所癌化学療法分野 柴田浩行先生(現：秋田大学医学部医学科臨床腫瘍学 教授) ご指導の下、薬学部合成有機化学分野 岩渕好治先生をはじめとした諸先生方との共同研究により行われました。この場を借りて深謝いたします。

### 文 献

- 1) Conney, A.H., Lysz, T., Ferraro, T., et al. (1991) *Adv. Enzyme Regul.*, **31**, 385-396.
- 2) Ramachandran, C., Rodriguez, S., Ramachandran, R., et al. (2005) *Anticancer Res.*, **25**, 3293-3302.
- 3) Morimoto, T., Sunagawa, Y., Kawamura, T., et al. (2008) *J. Clin. Invest.*, **118**, 868-878.
- 4) Lim, G.P., Chu, T., Yang, F., et al. (2001) *J. Neurosci.*, **21**, 8370-8377.
- 5) Ohori, H., Yamakoshi, H., Tomizawa, M., et al. (2006) *Mol. Cancer Ther.*, **5**, 2563-2571.
- 6) Shibata, H., Yamakoshi, H., Sato, A., et al. (2009) *Cancer Science*, **100**, 956-960.

— 東邦大学額田奨学基金奨学優秀賞 —

# 生体防御における MafK 転写因子複合体の機能解析

加 藤 恭 丈

東北大学大学院医学系研究科 生物化学分野



## 1. はじめに

生体は、外部環境から常に様々なストレスを受けている。例えば、放射線や紫外線に曝露され、食餌からは植物の二次代謝産物、重金属といった親電子性物質、そして人工の食品添加物を体内に摂取している。また、ミトコンドリアにおける分子酸素の還元過程では活性酸素種（フリーラジカル）が生じる。生体がこれらの物質やその生体内代謝産物を十分に処理できなくなった場合には、生体に活性酸素種の蓄積や、より反応性の高い活性酸素種の生成が起こり、いわゆる酸化ストレス状態を招く。その結果、老化が進行したり、動脈硬化や発癌などの疾患に罹患しやすくなることが知られている<sup>1)</sup>。

活性酸素の生成は、細胞内の酸化還元反応（レドックス状態）を乱すことになるが、一方で、生体は酸化ストレス応答という生体防御機構を確立してきた。この生体防御機構が生体内の恒常性維持に必須であることは、容易に想像される。近年、酸化ストレス応答の転写制御に、Nrf2 (NF-E2 related factor 2)、Bach1 (BTB and CNC homology1) そして小 Maf 因子が関与することが明らかになっている<sup>2,3)</sup>。酸化ストレス応答遺伝子のひとつであるヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) は、酸化ストレスに応答してその発現が強く誘導されるヘム分解酵素であり、生体防御に重要な役

割を果たす<sup>2,3)</sup>。この遺伝子を例にとってみると、酸化ストレス応答性の転写誘導は同遺伝子上流に存在する複数の Maf 認識配列 (MARE) により制御される。通常は小 Maf 因子（例えば MafK）と Bach1 とのヘテロ二量体が MARE に結合して転写を抑制するが、酸化ストレス下では Bach1 が不活性化され、かわりに MafK と Nrf2 とのヘテロ二量体が MARE に結合して HO-1 遺伝子の転写を活性化する<sup>3,4)</sup>。すなわち、MafK は転写の抑制にも活性化にも作用する点で興味深い因子である (図 1)。私たちは、MafK による抑制化と活性化の分子機構に着目し、研究を進めてきた。

## 2. MafK による酸化ストレス応答活性化機構

MafK は、トリ筋腱繊維肉腫ウイルス (AS42) の原因遺伝子である v-Maf の細胞性関連因子として単離された「癌関連転写因子」である。脊椎動物では、MafK と機能的にも構造的にも極めて類似する MafG や MafF もあり、小 Maf 因子と総称される。小 Maf 因子は、塩基性領域-ロイシンジッパー構造 (bZIP) を有しており、ロイシンジッパーを介してホモ二量体、あるいは他の bZIP 因子とのヘテロ二量体を形成し、塩基性領域を介して MARE に結合する。また、bZIP の N 末端側「Extended homology region (EHR)」と呼ばれる 25 アミノ酸からなる領域も MARE 認識に関わることが明らかにされている<sup>5)</sup> (図 2)。小 Maf 因子の全長はこのような機能ドメインでほぼ占められており、転写活性化ドメインや抑制化ドメインは持たない。

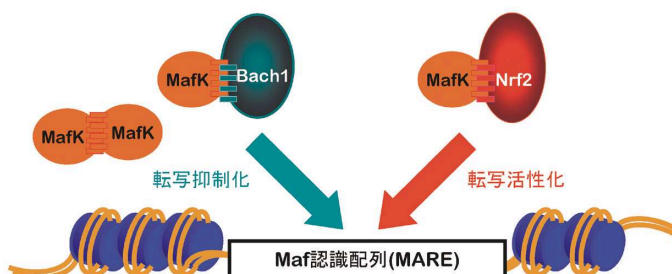


図 1. MafK は転写を抑制にも活性化にも作用する

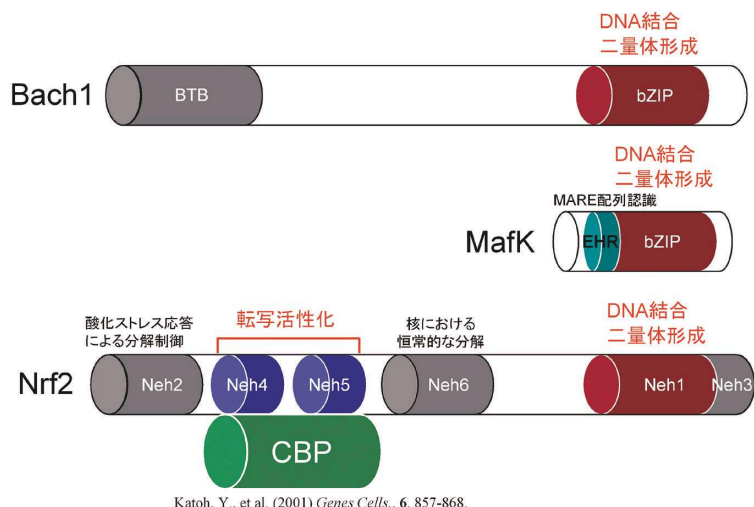


図2. Bach1 と Nrf2, MafK タンパク質の機能ドメイン

小 Maf 因子はそれ自体が転写を既定するというよりは、相方のパートナー分子の性状により転写制御能が決まる<sup>6)</sup>。

活性化パートナーの一つである Nrf2 蛋白質には、生物種間で高度に保存された領域が6カ所存在する。私たちは、これらの領域を Neh (Nrf2-ECH homology) ドメインと名付けた<sup>7)</sup> (図2)。Neh1 (= bZIP) を介して小 Maf 因子と二量体を形成して MARE に結合することから、他の Neh は転写活性化に関わると予想し、その機能の解明をめざした。各々の Neh ドメインに注目して転写活性化領域の同定をおこない、Neh4 と Neh5 が転写活性化の機能ドメインであることを見出した。そして、これらのドメインが、転写共役因子(コファクター)である CBP (CREB binding protein) と結合して、協調的な転写活性化能を発揮することも明らかにした<sup>8)</sup> (図2)。Nrf2 は通常はユビキチン化により分解されているが、酸化ストレス下では分解が阻害され、蓄積する。すると、小 Maf 因子/Nrf2 二量体が形成され HO-1 などの標的遺伝子に結合し、CBP を動員することにより転写活性化を引き起こすと考えられる。非酸化ストレス時には小 Maf 因子/Bach1 二量体が HO-1 遺伝子に結合していることから、小 Maf 因子はパートナー分子を取り替えることにより転写抑制から活性化まで、酸化ストレス応答の全過程に関与すると言える。MafK/Bach1 ヘテロ二量体は HO-1 遺伝子に加え、フェリチン遺伝子などの一連の酸化ストレス応答遺伝子の転写を抑制することから、小 Maf 因子による転写抑制と活性化は酸化ストレス応答の基本型と考えられる<sup>9)</sup>。

### 3. MafK 複合体の解析

MafK は転写抑制にも活性化にも作用するが、そこ

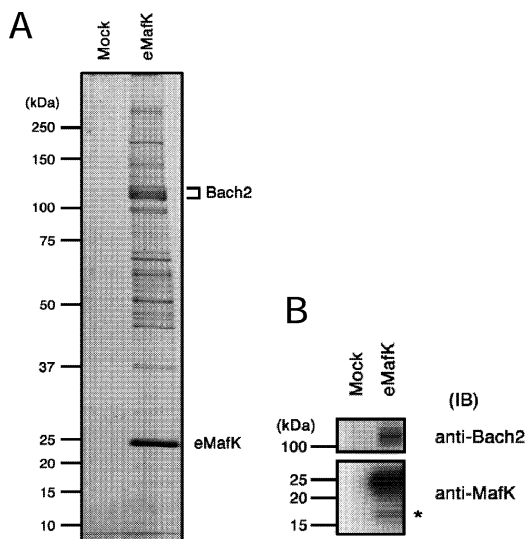


図3. MafK 転写因子複合体

(A) マウス成熟 B 細胞株 BAL17 細胞から精製した MafK 転写因子複合体。FLAG-HA-ヒスチジンタグを融合させた MafK 蛋白質(eMafK) の発現細胞から核抽出物を調製し、抗 FLAG 抗体結合ビーズとニッケルレジンによる二段階アフィニティー精製をおこなった。(B) (A)の MafK 転写因子複合体を用いたウエスタンブロット解析。MafK 転写因子複合体には Bach2 が含まれていた。星印は、内在性の MafK の検出を表す。(Ochiai, K., et al. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 38226-38234.)



に関わるタンパク質群の全貌は不明である。例えば、Bach1 の関連因子である Bach2 は、B リンパ球特異的に発現しており、B 細胞の活性化に伴う体細胞突然変異 (SHM) や、抗体のクラススイッチ組み換え (CSR) に必須の因子である<sup>10)</sup>。このことから、MafK は B リンパ球特異的な複合体も形成すると予想される。そこで、MafK 複合体を様々な細胞から精製し、その構成因子を質量分析法にて同定することを進めている。これまでに、成熟 B 細胞株、形質細胞株、肝癌由来細胞株から、MafK 転写因子複合体を精製した (図 3)。そして、成熟 B 細胞株において、MafK が Bach2 とヘテロ二量体を形成していること、この二量体が形質細胞分化のマスター制御因子 Blimp-1 の遺伝子発現を抑制することを明らかにした<sup>11)</sup>。また、転写抑制コファクター候補分子やユビキチン化 E3 リガーゼ候補分子なども同定している。現在、これらタンパク質の機能について解析を進めている。具体的には、RNA 干渉法によって、各構成因子の発現をノックダウンし、Blimp-1 遺伝子や HO-1 遺伝子など MafK の標的遺伝子の発現が変化するかどうかを調べている。また、遺伝子発現にはクロマチン修飾変化が伴うので、標的遺伝子上ヒストンの化学修飾の変化などにも着目している。得られる情報を統合することにより、MafK が関わる核内タンパク質ネットワークのマップを作成し、このネットワークが酸化ストレス応答や液性免疫といった生体にとって必須のシステムを制御する共通機構であることを実証していきたい。

#### 4. おわりに

小 Maf 因子は本邦において発見された癌関連蛋白質であり、その後の機能解析も、本邦の研究者らが世界をリードしてきた。小 Maf 因子は酸化ストレス応答と液性免疫という、一見全く関係のない生命現象を制御する。将来、一連の研究成果から、MafK を中心とする蛋白質ネットワークを明らかにできれば、酸化ストレスや免疫応答の制御機構をより深く理解できると考えている。さらに、研究を発展させることにより、これら生体防御系を統一的に理解することも可能ではないかと期待している。また、このシステムが乱れることにより細胞が癌化する仕組みも明らかになるであろう。

#### 謝 辞

MafK 複合体に関する研究は、東北大学大学院医学

系研究科生物化学分野 五十嵐和彦教授はじめ諸先生方との共同研究によりおこなわれています。また、転写因子 Nrf2 の研究は、東北大学大学院医学系研究科医化学分野 山本雅之教授、弘前大学医学部附属高度先端医学研究センター 伊東健教授、東北大学医学アイソトープセンター 本橋ほづみ准教授の御指導の下、おこなわれました。この場を借りて深謝いたします。

#### 文 献

- 1) Repine, J.E., et al. (1997) Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Oxidative stress study group. Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **156**, 341-357.
- 2) Ishii, T., et al. (2000) Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J. Biol. Chem.*, **275**, 16023-16029.
- 3) Sun, J., et al. (2004) Heme regulates the dynamic exchange of Bach1 and NF-E2-related factors in the Maf transcription factor network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **101**, 1461-1466.
- 4) Igarashi, K., et al. (2006) The heme-Bach1 pathway in the regulation of oxidative stress response and erythroid differentiation. *Antioxid. Redox. Signal.*, **8**, 107-118.
- 5) Kusunoki, H., et al. (2002) Solution structure of the DNA-binding domain of MafG. *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 252-256.
- 6) Motohashi, H., et al. (2002) Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors. *Gene*, **294**, 1-12.
- 7) Itoh, K., et al. (1999) Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.*, **13**, 76-86.
- 8) Katoh, Y., et al. (2001) Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes Cells.*, **6**, 857-868.
- 9) Hintze, K.J., et al. (2007) Bach1 repression of ferritin and thioredoxin reductase1 is heme-sensitive in cells and in vitro and coordinates expression with heme oxygenase1, beta-globin, and NADP(H) quinone (oxido) reductase1. *J. Biol. Chem.*, **282**, 34365-34371.
- 10) Muto, A., et al. (2004) The transcriptional programme of antibody class switching involves the repressor Bach2. *Nature*, **429**, 566-571.
- 11) Ochiai, K., et al. (2006) Plasmacytic transcription factor Blimp-1 is repressed by Bach2 in B cells. *J. Biol. Chem.*, **281**, 38226-38234.



## 平成 20 年度 各分野における各種学会賞等の受賞者

氏 名	分野・診療科 (部) 名	受賞学会 (研究会) 名	受 賞 名	受賞年月
郭 琪	内部障害学分野	東北大学	Takahashi Memorial Award	2008 年 2 月
今西 里佳	内部障害学分野	日本ストーマ・排泄リハビリテーション学会	学会長賞	2008 年 2 月
中野 誠	循環器病態学分野	第 73 回循環器学会	Young Investigator's award	2008 年 3 月
山下 慎一	泌尿器科学分野	第 96 回日本泌尿器科学会	総会賞	2008 年 4 月
Kit I Tong	医化学分野	Oxgen Club of California 2008 World Congress	Elsevier-Archives of Biochemistry and Biophysics Award	2008 年 4 月
角田 洋一	消化器内科	第 15 回分子消化器病研究会	特別賞	2008 年 4 月
中澤 徹	眼科	日本眼科学会	学術奨励賞	2008 年 4 月
中澤 徹	眼科	ロート製薬	ロートアワード	2008 年 4 月
石田 篤子	内部障害学分野	国際高血圧学会	ISH Hypertension Travel Grant	2008 年 5 月
伊藤 大亮	内部障害学分野	国際高血圧学会	ISH Hypertension Travel Grant	2008 年 5 月
阿部 浩明	肢体不自由学分野	日本理学療法学術大会	日本理学療法学術大会大会長賞	2008 年 5 月
山本 雅之	医化学分野	日産科学振興財団	第 15 回日産科学賞	2008 年 5 月
井倉 毅	生物化学分野	日本生化学会 東北支部	日本生化学会東北支部奨励賞	2008 年 5 月
岡 芳知	分子代謝病態学分野	日本糖尿病学会	日本糖尿病学会学会賞 (ハーゲドーン賞)	2008 年 5 月
阿部 倫明	腎・高血圧・内分泌科	第 8 回日本 NO 学会	優秀賞	2008 年 5 月
松橋 俊夫 他 9 名	放射線診断科	International Symposium on Interventional Radiology and New Vascular Imaging	Certificate of Merit	2008 年 5 月
長谷川久隆	婦人科学分野	第 49 回日本哺乳動物卵子学会	学術奨励賞	2008 年 5 月

氏 名	分野・診療科 (部) 名	受賞学会 (研究会) 名	受 賞 名	受賞年月
長坂 誠	内部障害学分野	日本リハビリテーション医学会	海外研修助成者	2008 年 6 月
遠藤 千顕	呼吸器再建研究 分野		黒川利雄記念がん研究基金	2008 年 6 月
杉山 謙	肢体不自由学分 野	日本リハビリテーション医学会	日本リハビリテーション医 学会論文賞 優秀論文賞	2008 年 6 月
鈴木 昭彦	腫瘍外科学分野	宮城県対がん協会	第 19 回黒川利雄がん研究 助成金賞	2008 年 6 月
海老原 覚	老年科	ノバルティス老化およ び老年医学研究基金	2008 年度 (第 22 回) 研究助 成	2008 年 6 月
吉川 雄朗	先端再生生命科 学寄附講座	東洋紡百周年記念バイ オテクノロジー研究財 団	短期研究助成 (海外学会発 表)	2008 年 6 月
黒河 博文	医化学分野	第 21 回内藤コンファ レンス	内藤コンファレンス ポス ター賞	2008 年 6 月
小原 範之	消化器病態学分 野	第 44 回肝臓学会総会	会長奨励賞	2008 年 6 月
中谷 和弘	耳鼻咽喉・頭頸 部外科	第 57 回日本耳鼻咽喉 科学会 東北地方部会 連合学術講演会	最優秀演題賞 研究部門 (Research Forum)	2008 年 7 月
桂 一憲	先進外科学分野	日本外科代謝栄養学会	第 21 回学会賞	2008 年 7 月
高橋 巖	先端再生生命科 学寄附講座	FCCA (フォーラム「糖 質の時代がやってき た」)	川口吉太郎トラベル基金 (川口基金)	2008 年 8 月
今西 里佳	内部障害学分野	日本排尿機能学会	優秀演題賞	2008 年 9 月
泉 秀明	泌尿器科学分野	第 239 回日本泌尿器科 学会 東北地方会	最優秀賞	2008 年 9 月
坂本 一寛・ 虫明 元	生体システム生 理学分野	日本神経回路学会	研究賞	2008 年 9 月
多那 千絵	行動医学分野	第 7 回日本 Neurogas- troenterdogy 学会	奨励賞	2008 年 9 月
中澤 徹	眼科	緑内障学会	須田賞	2008 年 9 月
中川 晴夫	泌尿器科学分野	ICS 2008	Award for Innovative Research Presented on Nocturnal Voiding Prob- lems	2008 年 10 月

氏 名	分野・診療科 (部) 名	受賞学会 (研究会) 名	受 賞 名	受賞年月
田口 恵子	医化学分野	日本薬学会	日本薬学会環境・衛生部会	2008 年 10 月
嘉数 英二	消化器内科	日本肝臓学会	第 10 回味の素 award	2008 年 10 月
松原 洋一	遺伝病学分野	日本先天代謝異常学会	日本先天代謝異常学会賞	2008 年 11 月
三須 建郎	多発性硬化症治 療学寄附講座	PACTRIMS 2008	Best Presentation Award	2008 年 11 月
金子さゆり	医療管理学分野	日本医療・病院管理学会	日本医療・病院管理学会賞 (論文)	2008 年 11 月
渡辺 諭史	行動医学分野	第 8 回 IBS Forum	特別奨励賞	2008 年 11 月
金村 政輝	総合診療部	第 67 回日本公衆衛生 学会総会	優秀ポスター賞	2008 年 11 月
中山 恵輔	腎不全対策研究 寄附講座	日本腎臓学会	CKD Award 2008	2008 年 11 月
加藤 俊介 他 8 名	癌化学療法研究 分野	第 46 回日本癌治療学 会総会	優秀演題 (ポスター・口演発表)	2008 年 11 月
工藤千枝子 他 7 名	癌化学療法研究 分野	第 2 回リトリート大学 院生研究会発表会	優秀ポスター賞・優秀質問 賞	2008 年 11 月
塚本 信和	消化器外科分野	2008 American Pan- creatic Association	Travel Award	2008 年 11 月
中川 敦寛	脳神経外科	第 29 回日本レーザー 医学会総会	総会賞	2008 年 11 月
高橋 巖	先端再生生命科 学寄附講座	第 20 回分子糖尿病学 シンポジウム	Research Travel Grand	2008 年 12 月
村田 隆紀	放射線診断科	RSNA (北米放射線学 会)	Certificate of Merit	2008 年 12 月
日向野修一	放射線診断科	RSNA (北米放射線学 会)	Cum Raude	2008 年 12 月
有明 恭平	消化器外科分野	第 2 回東北大学医学系 研究科リトリート	優秀演題賞	2008 年 12 月
加藤 恭丈	生物化学分野	学校法人 東邦大学	額田奨学基金 奨学優秀賞	2009 年 1 月
藤村 茂 他 3 名	抗感染症薬開発 研究部門	日本環境感染学会	第 5 回日本環境感染学会賞	2009 年 2 月